Adriana Salazar Montes • Ana Sandoval Rodríguez
Juan Armendáriz Borunda

BIOLOGÍA MOLECULAR

Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud

Mc Graw Hill Education

BIOLOGÍA MOLECULAR

Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud

Adriana María Salazar Montes
Instituto de Biología Molecular en Medicina, Centro Universitario de Ciencias de la Salud
Universidad de Guadalajara

Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Instituto de Biología Molecular en Medicina, Centro Universitario de Ciencias de la Salud
Universidad de Guadalajara

Juan Socorro Armendáriz Borunda
Instituto de Biología Molecular en Medicina, Centro Universitario de Ciencias de la Salud
Universidad de Guadalajara
O.P.D. Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca"

Mc Graw Hill Education

MÉXICO • BOGOTÁ • BUENOS AIRES • CARACAS • GUATEMALA • MADRID • NUEVA YORK
SAN JUAN • SANTIAGO • SAO PAULO • AUCKLAND • LONDRES • MILÁN • MONTREAL
NUEVA DELHI • SAN FRANCISCO • SINGAPUR • ST. LOUIS • SIDNEY • TORONTO

Director editorial: Javier de León Fraga
Editor sponsor: Emilio Salas Castillo
Editor de desarrollo: Héctor F. Guerrero Aguilar
Supervisor de producción: Juan José Manjarrez de la Vega

NOTA

La medicina es una ciencia en constante desarrollo. Conforme surjan nuevos conocimientos, se requerirán cambios de la terapéutica. El(los) autor(es) y los editores se han esforzado para que los cuadros de dosificación medicamentosa sean precisos y acordes con lo establecido en la fecha de publicación. Sin embargo, ante los posibles errores humanos y cambios en la medicina, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación de la obra garantizan que la información contenida en ella sea precisa o completa, tampoco son responsables de errores u omisiones, ni de los resultados que con dicha información se obtengan. Convendría recurrir a otras fuentes de datos, por ejemplo, y de manera particular, habrá que consultar la hoja informativa que se adjunta con cada medicamento, para tener certeza de que la información de esta obra es precisa y no se han introducido cambios en la dosis recomendada o en las contraindicaciones para su administración. Esto es de particular importancia con respecto a fármacos nuevos o de uso no frecuente. También deberá consultarse a los laboratorios para recabar información sobre los valores normales.

BIOLOGÍA MOLECULAR

Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra,
por cualquier medio, sin autorización escrita del editor.

Mc Graw Hill Education

DERECHOS RESERVADOS © 2013, respecto a la primera edición en español por,
McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.
Prolongación Paseo de la Reforma 1015, Torre A, Piso 17, Col. Desarrollo Santa Fe,
Delegación Álvaro Obregón
C. P. 01376, México, D. F.
Miembro de la Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana Reg. No. 736

ISBN: 978-607-15-0912-3

1234567890 2456789013

Impreso en México Printed in Mexico

Editores

Adriana María Salazar Montes

Licenciada en Biología. Maestra en Ciencias en Biología Celular. Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Universidad de Guadalajara. Posdoctorado en la Universidad de Tuffs, Boston, Estados Unidos.

Obtuvo Doctorado en la Universidad de Guadalajara en el área de Biología Molecular y realizó su estancia posdoctoral en la Universidad de Tuffs, en Boston, Estados Unidos. Es profesora investigadora y en este momento encargada del Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica. Es profesora del Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina y del Doctorado en Farmacología de la Universidad de Guadalajara. En la actualidad es editora asociada de la *Revista Archivos de Ciencias*, órgano oficial del Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

Ana Soledad Sandoval Rodríguez

Quimicofarmacobióloga de formación con Doctorado en Ciencias Biomédicas, con orientación en Inmunología. Universidad de Guadalajara. Posdoctorado en el Centro de Investigaciones Médicas Aplicadas de la Universidad de Navarra, en España.

Obtuvo Doctorado en la Universidad de Guadalajara en el área de las Ciencias Biomédicas. Realizó su estancia posdoctoral en la Universidad de Navarra, en España, en el Centro de Investigaciones Médicas Aplicadas. Es profesora investigadora del Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, responsable del área de Terapia Celular. Es profesora del Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina de la Universidad de Guadalajara. En la actualidad es editora asociada de la *Revista Archivos de Ciencias*, órgano oficial del Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

Juan Armendáriz Borunda

Licenciado en Farmacología. Maestría y Doctorado en Bioquímica en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Posdoctorado en la Universidad de Tennessee, Memphis, Estados Unidos.

Obtuvo Doctorado en Bioquímica en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, y Posdoctoral en la Universidad de Tennessee, Memphis, Estados Unidos. Es profesor investigador del Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica y actualmente jefe del Departamento de Biología Molecular y Genómica. Es profesor del Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina, del Doctorado en Genética y del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Guadalajara. En la actualidad es editor de la *Revista Archivos de Ciencias*, órgano oficial del Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

Colaboradores

Blanca Estela Alcántar Díaz

Doctora en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Universidad Autónoma de Nayarit.

Bertha Adriana Álvarez Rodríguez

Doctora en Genética. Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Juan Armendáriz Borunda

Doctor en Bioquímica. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Blanca Estela Bastidas Ramírez

Doctora en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Óscar Gabriel Béjar Mejía

Licenciatura en Deportes. Especialidad en Natación. Consejo Municipal del Deporte de Guadalajara.

Miriam Ruth Bueno Topete

Doctora en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Enfermedades Crónico Degenerativas, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Paola B. Castro García

Doctora en Neurociencias. Posdoctoral en Division of Stem Cell Biology. Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University.

Adriana Díaz Rivera

Licenciatura en Biología. Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Martha Escoto Delgadillo

Doctora en Ciencias en Biología Celular. Instituto de Patología Infecciosa y Experimental "Dr. Francisco Ruiz Sánchez" de la Universidad de Guadalajara. Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Lucía Flores Contreras

Licenciatura en Biología. Doctorado en Genética. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Jorge Fernando Floresvillar Mosqueda

Licenciatura en Microbiología. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Orientación Inmunológica. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Jesús Javier García Bañuelos

Doctor en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Biología Molecular y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Belinda Claudia Gómez Meda

Doctora en Genética. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Jaime González Cuevas

Doctor en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Angélica Sofía González Garibay

Licenciatura en Nutrición. Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Daniela Gordillo Bastidas

Doctora en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Coordinación de la Carrera de Nutrición, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

Elizabeth Gordillo Bastidas

Doctora en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

César Guardado Mora

Licenciatura en Quimicofarmacobiólogo. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Carmen Magdalena Gurrola Díaz

Doctorado en Ciencias, Patología Molecular y Biología Molecular del Cáncer. Instituto de Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Zamira Helena Hernández Nazará

Doctora en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Luis Daniel Hernández Ortega

Licenciatura en Quimicofarmacobiólogo. Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Selene Guadalupe Huerta Olvera

Doctora en Toxicología. Departamento de Ciencias Médicas y de la Vida, Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. OPD Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca".

María Cristina Islas Carbajal

Doctora en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Investigación Cardiovascular, Departamento de Fisiología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

David Alejandro López de la Mora

Licenciatura en Quimicofarmacobiólogo. Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Alfonso López Vázquez

Licenciatura en Médico Cirujano Partero. Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

José Guadalupe Macías Barragán

Doctor en Ciencias Biomédicas. Orientación Inmunológica. Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara.

Ana Laura Márquez Aguirre

Doctorado en Ciencias Biomédicas con Orientación en Inmunología. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Abril Bernardette Martínez Rizo

Doctora en Ciencias Biomédicas. Orientación Inmunológica. Universidad Autónoma de Nayarit.

Carlos Mata Munguía

Doctor en Genética. Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Mayra Guadalupe Mena Enríquez

Licenciatura en Biología. Doctorado en Genética. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Alejandra Meza Ríos

Licenciatura en Quimicofarmacobiólogo. Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Silvia Mora Lee

Doctora en Neurociencias. Laboratorio de Ciencias Biomédicas y Biotecnología, Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara.

José Navarro Partida

Doctor en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Viviana Carolina Núñez Valdez

Licenciatura en Biología. Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Ana Rosa Rincón Sánchez

Doctora en Farmacología. Instituto de Investigación Cardiovascular, Departamento de Fisiología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Samantha Rivero-Borrel Sandoval

Licenciatura en Médico Cirujano Partero. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Adriana María Salazar Montes

Doctora en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Laura Verónica Sánchez Orozco

Doctora en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Enfermedades Crónico Degenerativas, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

María Guadalupe Sánchez Parada

Licenciatura en Médico Cirujano Partero. Doctorado en Genética. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Ana Soledad Sandoval Rodríguez

Doctora en Ciencias Biomédicas. Orientación Inmunológica. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Pablo Manuel Saucedo Galindo

Entrenador.

Eduardo Vázquez Valls

Maestro en Ciencias en Biología Celular. Instituto de Patología Infecciosa y Experimental "Dr. Francisco Ruiz Sánchez" de la Universidad de Guadalajara. Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social.

José María Vera Cruz

Doctor en Ciencias en Biología Molecular en Medicina. Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Ana Lourdes Zamora Pérez

Doctora en Genética. Instituto de Investigación en Odontología, Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Guillermo Moisés Zúñiga González

Doctor en Genética. Laboratorio de Mutagénesis, División de Medicina Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Contenido

Prólogo

Parte I

Conceptos básicos de biología molecular 1

Capítulo 1

Historia de la biología molecular 3

José María Vera Cruz
Adriana María Salazar Montes
César Guardado Mora
Juan Armendáriz Borunda

Capítulo 2

Ciclo celular 15

Blanca Estela Alcántar Díaz
Luis Daniel Hernández Ortega
Adriana María Salazar Montes

Capítulo 3

Estructura de ácidos nucleicos 25

José Navarro Partida
Mayra Mena Enríquez

Capítulo 4

Replicación 36

Jorge Fernando Floresvillar Mosqueda
José Guadalupe Macías Barragán

Capítulo 5

Transcripción 44

Zamira Helena Hernández Nazará

Capítulo 6

Traducción 52

José María Vera Cruz
Bertha Adriana Álvarez Rodríguez
Belinda Claudia Gómez Meda

Capítulo 7

Regulación de la expresión génica 66

Adriana María Salazar Montes
Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Juan Armendáriz Borunda

Capítulo 8

Mutaciones 75

María Guadalupe Sánchez Parada
Belinda Claudia Gómez Meda

Capítulo 9

Mecanismos de reparación del ADN 82

Mayra Guadalupe Mena Enríquez
Lucía Flores Contreras
Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Juan Armendáriz Borunda

Parte II

Metodología del ADN recombinante 91

Capítulo 10

Manejo de muestras para estudios moleculares 93

Jesús Javier García Bañuelos
Blanca Estela Bastidas Ramírez
Elizabeth Gordillo Bastidas
Daniela Gordillo Bastidas

Capítulo 11

Métodos de extraccción de ácidos nucleicos 99

Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Abril Bernardette Martínez Rizo
David Alejandro López de la Mora

Capítulo 12

Electroforesis 110

David Alejandro López de la Mora
Ana Soledad Sandoval Rodríguez

Capítulo 13

Enzimas de restricción 120

Jaime González Cuevas
Miriam Ruth Bueno Topete
Ana Soledad Sandoval Rodríguez

Capítulo 14

Vectores de clonación y expresión 127

Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Mayra Mena Enríquez
Ana Laura Márquez Aguirre

Capítulo 15

Técnicas de hibridación 139

Miriam Ruth Bueno Topete
Jaime González Cuevas

Capítulo 16

Reacción en cadena de la polimerasa 145

Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Alejandra Meza Ríos
Jorge Fernando Floresvillar Mosqueda

Capítulo 17

Secuenciación del ADN y microarreglos 160

Belinda Claudia Gómez Meda
Guillermo Moisés Zúñiga González
José María Vera Cruz
Bertha Adriana Álvarez Rodríguez

Capítulo 18

Polimorfismos de ADN y huella genética 171

Belinda Claudia Gómez Meda
Ana Lourdes Zamora Pérez
María Guadalupe Sánchez Parada

Parte III

Bases moleculares de las enfermedades 181

Capítulo 19

Bases moleculares de las patologías humanas 183

José Macías Barragán
Selene Guadalupe Huerta Olvera

Capítulo 20

Enfermedades monogénicas 191

Silvia Mora Lee
Paola B. Castro García

Capítulo 21

Bases moleculares del cáncer 197

Carmen Magdalena Gurrola Díaz

Capítulo 22

Bases moleculares de la diabetes mellitus 204

Ana Rosa Rincón Sánchez
María Cristina Islas Carvajal

Capítulo 23

Bases moleculares de la obesidad 218

Blanca Estela Bastidas Ramírez
Angélica Sofía González Garibay
Alfonso López Vázquez
Viviana Carolina Núñez Valdez

Capítulo 24

Bases moleculares de la hepatitis B 227

Laura Verónica Sánchez Orozco
Miriam Ruth Bueno Topete
Juan Armendáriz Borunda

Capítulo 25

Bases moleculares de la hepatitis C 235C

Laura Verónica Sánchez Orozco
David A. Fernández Galindo
Miriam Ruth Bueno Topete
Juan Armendáriz Borunda

Capítulo 26

Bases moleculares del virus de la inmunodeficiencia humana 241

Martha Escoto Delgadillo
Carlos Mata Munguía
Eduardo Vázquez Valls

Parte IV

Tópicos selectos 255

Capítulo 27

Terapia génica 257

Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Juan Armendáriz Borunda
Adriana María Salazar Montes
Adriana Díaz Rivera

Capítulo 28

Animales transgénicos y clonación 268

Jesús Javier García Bañuelos
Blanca Estela Bastidas Ramírez
Juan Armendáriz Borunda

Capítulo 29

Nutrigenómica y nutrigenética 277

Blanca Estela Bastidas Ramírez
Jesús Javier García Bañuelos
Elizabeth Gordillo Bastidas
Daniela Gordillo Bastidas

Capítulo 30

Biología molecular del deporte 287

Óscar Gabriel Béjar Mejía
Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Pablo Manuel Saucedo Galindo
Samantha Rivero-Borrel Sandoval

Capítulo 31

Dopaje génico 298

Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Óscar Gabriel Béjar Mejía
Adriana María Salazar Montes
Jesús Javier García Bañuelos

Capítulo 32

Proyecto del Genoma Humano: aportaciones a la medicina 305

Adriana María Salazar Montes
Luis Daniel Hernández Ortega
Juan Armendáriz Borunda

Índice alfabético

Agradecimientos

Escribir un libro de texto es tarea muy complicada, pero si este trabajo se concluye de manera exitosa es en buena medida gracias a las personas que influyen en su realización. Queremos manifestar nuestro agradecimiento a quienes, de forma directa o indirecta, contribuyeron al resultado que el lector tiene en sus manos.

En primer lugar, a los miembros del comité editorial, con cuyos comentarios y nuestras discusiones sobre los temas y capítulos estuvieron siempre solícitos a enriquecer el contenido con sus puntos de vista, a cualquier hora del día.

A todos y cada uno de los colaboradores de los capítulos que conforman esta obra, por el tiempo dedicado y el empeño dispuesto para que este libro de texto sea comprensible al alumno de pregrado, donde comparten sus conocimientos en las diferentes ramas y aplicaciones de la Biología Molecular.

A los alumnos de los cursos de Biología Molecular de pregrado y posgrado, quienes con sus preguntas, dudas y comentarios enriquecieron los temas que abarca este libro. Mucho de lo que aprendimos respecto de la manera de redactar dichos temas con mayor claridad fue impartiendo estos cursos. Gracias a todos ellos.

A la editorial McGraw-Hill, que tuvo gran paciencia con este proyecto y perseveró en su edición, corrección y elaboración. Por su enorme entusiasmo y dedicación, nuestro sincero agradecimiento.

Los autores

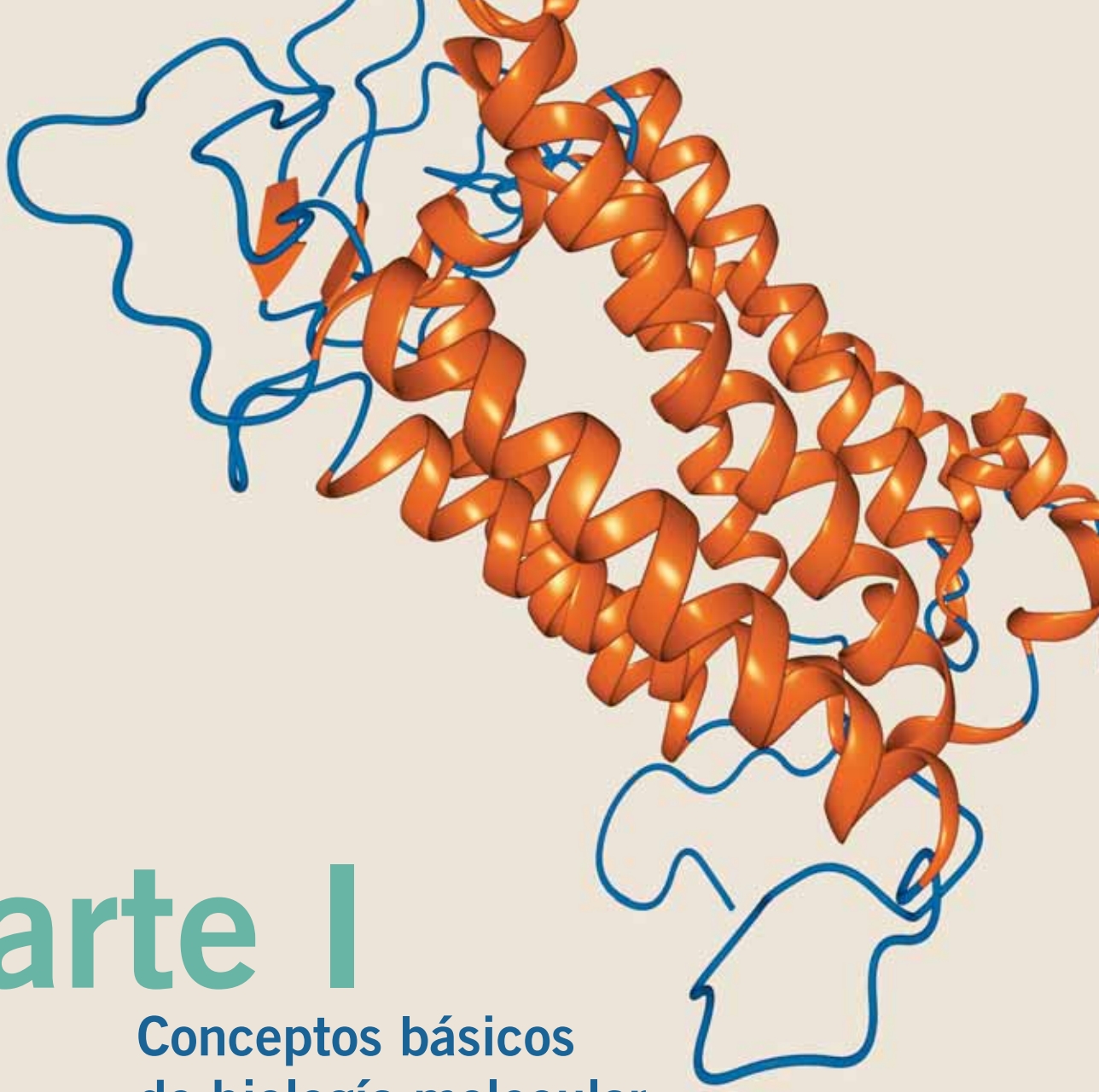
Prólogo

El enorme avance de la biología molecular en los últimos sesenta años ha venido a revolucionar la manera de visualizar la medicina y la biología en general. En el área de la biología molecular, todos los días se publican datos nuevos que nos permiten una mejor comprensión y un entendimiento más amplio de los procesos biológicos. Aunque la estructura y función de los genes en el genoma humano parece simple, al adentrarnos un poco más en su estudio nos asombramos de cuán complejos son. Los estudios logrados en el campo de la biología molecular aplicados a la medicina y a la ingeniería genética han generado enormes avances como consecuencia del entendimiento de las bases moleculares de los fenómenos biológicos que suceden en el organismo, lo que en el campo de la medicina ha permitido ofrecer a los pacientes diagnósticos y tratamientos más certeros, logrando así establecer una conexión estrecha antes inexistente entre las ciencias básicas y las disciplinas clínicas. Podemos finalmente entender la importancia que ha cobrado la biología molecular en el desarrollo de la vida moderna, por lo cual múltiples universidades la han incluido dentro de sus planes de estudios como una materia obligatoria. Esta medida pretende que los estudiantes de las ciencias de la salud, tanto de licenciatura como de maestría y doctorado, conjunten los conocimientos pasados con los actuales y sean capaces de entender los mecanismos moleculares que suceden dentro de las células de todos los organismos vivos, y cómo un agente genético, un microorganismo o un factor ambiental puede modificarlos, ocasionando así una patología.

Este libro ofrece al lector adentrarse en el campo de la biología molecular al presentarle un panorama general y a la vez profundo de cada uno de los temas planteados, con un abordaje sencillo y didáctico de los eventos moleculares que ocurren dentro de nuestras células, de las principales técnicas empleadas en un laboratorio de biología molecular para su estudio y aplicadas al diagnóstico, y de qué manera, con ayuda de la biotecnología y la ingeniería genética, estos procesos pueden ser modificados con la finalidad de mejorar o revertir el curso de un proceso fisiológico anormal, con intención de regresar al organismo a la homeostasis.

El texto está dividido en cuatro partes: la primera se enfoca a estudiar los aspectos básicos de la biología molecular, la estructura y función de las principales moléculas que participan en el flujo de la información genética como lo son el ADN, el ARN y las proteínas, así como los mecanismos que controlan su síntesis. También se expone con detalle aquellos mecanismos involucrados en el control de la expresión de los genes de manera positiva y negativa. La segunda parte presenta las principales técnicas de biología molecular e ingeniería genética aplicadas a la medicina, con el fin de ofrecer a los pacientes diagnósticos más certeros y oportunos. La tercera sección muestra un panorama amplio de las bases moleculares implicadas en el desarrollo de diversas patologías humanas, y por último, la cuarta parte brinda una revisión actual de temas especializados y de interés general, como terapia génica, organismos transgénicos, dopaje génico, nutrigenómica y proyecto del genoma humano. Sin lugar a dudas, el presente libro representa una herramienta muy útil para el estudio de la biología molecular en el área de las ciencias de la salud, y estamos seguros de que su lectura desarrollará en los estudiantes el gusto por esta fascinante rama de la ciencia.

Rui Pérez Tamayo

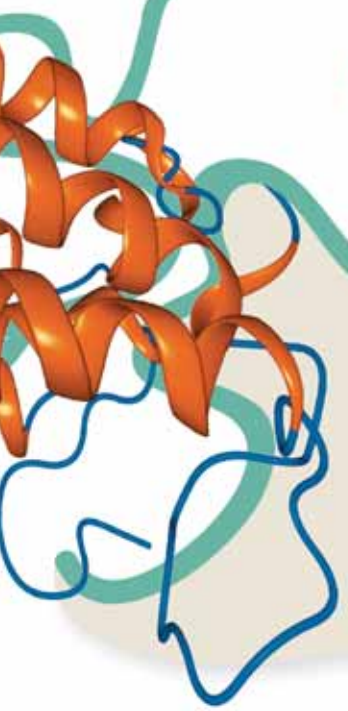


Parte I

Conceptos básicos de biología molecular

Contenido

Capítulo 1 Historia de la biología molecular
Capítulo 2 Ciclo celular
Capítulo 3 Ácidos nucleicos
Capítulo 4 Replicación
Capítulo 5 Transcripción
Capítulo 6 Traducción
Capítulo 7 Regulación de la expresión génica
Capítulo 8 Mutaciones
Capítulo 9 Mecanismos de reparación del ADN



Capítulo 1

Historia de la biología molecular

José María Vera Cruz / Adriana María Salazar Montes
César Guardado Mora / Juan Armendáriz Borunda

Introducción

La historia de la biología molecular implica muchas historias y todas ellas se encuentran entrelazadas. Sería muy complicado tratar de describirlas de manera individual y más si se presta atención a todos los acontecimientos que han tenido impacto en esta ciencia. Por ello, en este capítulo sólo se van a considerar algunos de los sucesos que han dejado huella de manera significativa en el desarrollo del área de la biología que hoy se conoce como ***biología molecular***.

Charles Darwin

Esta historia comienza a principios del siglo XIX, cuando Charles Darwin (figura 1-1) propuso la teoría del origen de las especies, en la que se plantea la preservación de las características más favorables de un organismo como consecuencia de un cambio en la secuencia del ADN, lo que en la actualidad se conoce como *mutación*.

Gregor Mendel

Posteriormente, en 1865, Johann Gregor Mendel, un monje agustino (figura 1-2), publica sus experimentos con plantas híbridas, y llama a los resultados de su investigación "**Leyes de la herencia"**, por lo que se le considera el padre de la genética.

Estos experimentos causaron un gran impacto en la comunidad científica, y le permitieron deducir que las características del organismo están determinadas por un par de factores, aportados por cada progenitor. Estas "unidades hereditarias" **(genes)** no se mezclan sino que se transmiten con toda la información, y uno de los factores resulta dominante sobre el otro (recesivo), lo que da origen a la formulación de las leyes fundamentales de la herencia. Sin embargo, nunca se preguntó por la naturaleza química de los genes ni por su localización dentro de las células.

Friedrich Miescher

Entre 1868 y 1869, el químico suizo Friedrich Miescher (figura 1-3), siendo posdoctorado en el laboratorio de Hoppe-Seyler (el acuñador del término *biochimie*), aisló los núcleos a partir de células presentes en pus de vendajes quirúrgicos, y comprobó que los núcleos contenían una sustancia química homogénea y no proteica a la que denominó **nucleína** (el término ***ácido nucleico*** fue acuñado posteriormente, en 1889, por Richard Altman). Según sus palabras, la nucleína es una "sustancia rica en fósforo localizada exclusivamente en el núcleo celular"; así, preparó el camino para la identificación de la molécula portadora de la información hereditaria, el ADN. Ese hecho excepcional hizo que Hoppe-Seyler decidiera demorar hasta 1871 la publicación de estos resultados, a la espera de la confirmación definitiva. Al principio esta investigación no pareció relevante, hasta que Albrecht Kossel llevó a cabo sus primeras investigaciones sobre la estructura química de la nucleína. En 1888, Kossel demostró que la nucleína de Miescher contenía proteínas y moléculas básicas ricas en nitrógeno, lo que llevó a la identificación de lo que hoy se conoce como bases nitrogenadas. También demostró la presencia de un glúcido de cinco átomos de carbono. Por este trabajo se le otorgó el Premio Nobel de Fisiología en 1910. Su vocación investigadora le introdujo en el área de la fisiología celular, donde destacó la importancia de las enzimas e intuyó el papel de los ácidos nucleicos en la herencia.

Thomas Hunt Morgan

En 1909, Thomas Hunt Morgan (figura 1-4), en la Universidad de Columbia, realizó unos experimentos hoy considerados clásicos sobre los rasgos genéticos ligados al sexo, lo que le hizo acreedor del Premio Nobel en 1933. Sus contribuciones científicas más importantes se centraron en el campo de la genética, y demostró que los cromosomas son

Figura 1-1. Charles Darwin.

portadores de los genes, lo que dio lugar a lo que se conoce como la teoría cromosómica de Sutton y Boveri. Gracias a su trabajo, la *Drosophila melanogaster* se convirtió en uno de los principales modelos en genética.

En 1910 descubrió una mosca mutante de ojos blancos entre individuos de estirpe silvestre de ojos rojos. La progenie del cruzamiento de un macho de ojos blancos con una hembra de ojos rojos presentó ojos rojos, lo que indicaba que el caracter "ojos blancos" era recesivo. Morgan denominó *white* al gen correspondiente, e inició así la tradición de nombrar a los genes según el fenotipo causado por sus alelos. Al cruzar estas moscas entre sí, se percató de que sólo los machos mostraban el caracter "ojos blancos". De sus experimentos, concluyó que:

1. Algunos caracteres se heredan ligados al sexo.
2. El gen responsable del caracter "ojos blancos" está en el cromosoma X.
3. Existe la posibilidad de que otros genes también residan en cromosomas específicos.

Figura 1-2. Gregor Mendel.

Figura 1-3. Friedrich Miescher.

Hunt y sus estudiantes analizaron las características de miles de moscas y estudiaron su herencia. Empleando la recombinación de los cromosomas, Morgan y Alfred Sturtevant prepararon un mapa con la localización de los genes en el cromosoma. Los resultados de sus investigaciones les permitieron escribir el libro *El mecanismo de la herencia mendeliana*.

Morgan también descubrió que algunas enfermedades, como la alcaptonuria, tienen su origen en una enzima defectuosa, fenómeno descrito por el físico inglés Archibald Garrod, que observó que las personas con ciertas anormalidades genéticas (errores innatos del metabolismo) carecían de ciertas enzimas. Con esta observación se relacionó a las proteínas (enzimas) con los cambios genéticos. En 1913, Calvin Bridges demostró que los genes están en los cromosomas; asimismo, Alfred Henry Sturtevant (como

Figura 1-4. Thomas Hunt Morgan.

Figura 1-5. Frederick Griffith.

Bridges, alumno de Morgan), demostró que algunos genes tienden a heredarse juntos y dedujo que se localizan en el mismo cromosoma.

En 1915 quedaron definitivamente establecidas las bases fundamentales de la herencia fenotípica y se publicó el libro *El mecanismo de la herencia mendeliana*, escrito por Thomas H. Morgan, Alfred Sturtevant, Hermann Muller y Calvin Bridges, en el que se establecían de forma definitiva las bases fundamentales de la herencia genotípica, se iniciaba la teoría cromosómica de la herencia y se consolidaba la edad de oro de la genética clásica.

ADN como material genético

Frederick Griffith

Oficial médico y genetista británico. En 1928 realizó lo que se conoce como "**experimento de Griffith**", en el que descubrió el "**principio transformante**", que hoy se conoce como ADN.

El experimento de Griffith (figura 1-6) tuvo lugar mientras investigaba una vacuna para prevenir la neumonía durante la pandemia de gripe que se produjo tras la Primera Guerra Mundial. Para ello usó dos cepas de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*: la cepa ***S*** (virulenta), que contenía una cápsula de polisacáridos, y la ***R*** (no virulenta), que carecía de ella. Cuando se inyectaba a ratones la cepa *S* causaba neumonía y muerte en un día o dos, ya que la cápsula permitía a la bacteria resistir los ataques del sistema inmune del hospedero. Cuando se inyectaba la cepa *R* no causaba neumonía. Si la cepa *S* se calentaba para matarla y se inyectaba en ratones perdía su virulencia y los ratones no desarrollaban neumonía. Sin embargo, si se inyectaban bacterias muertas de la cepa *S* mezcladas con bacterias vivas de la cepa *R* (*S*/*R*), los ratones infectados morían.

Al aislar la bacteria en la sangre de estos ratones se descubrió que la cepa *R*, anteriormente avirulenta, presentaba cápsula y se transformaba en *S*. Así, Griffith hipotetizó que existía un *principio transformante* presente en las bacterias muertas de la cepa *S* que hacía que las bacterias de la cepa *R* se transformaran en bacterias de tipo *S*.

William Thomas Astbury

En 1938, sir William Thomas Astbury (figura 1-7) y Florence Bell, de la Universidad de Leeds, en Inglaterra, al realizar

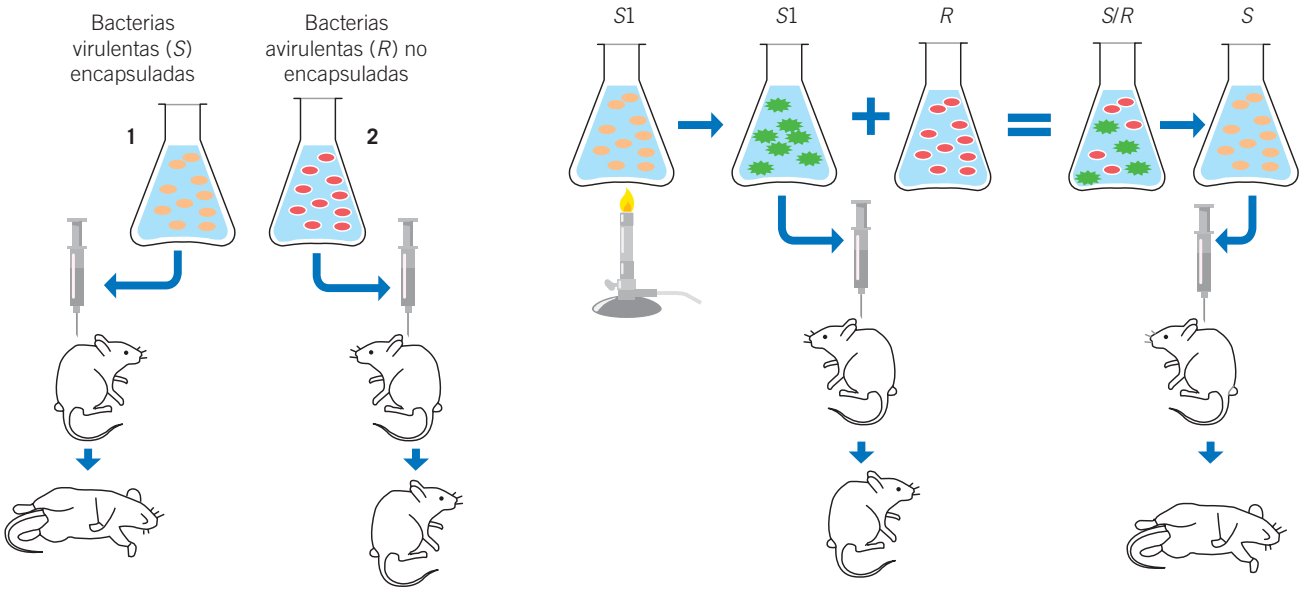


Figura 1-6. Experimento del principio transformante.

estudios de difracción por rayos X, propusieron que el ADN era una fibra compuesta de bases nitrogenadas apiladas a 0.33 nm unas de otras, perpendiculares al eje de la molécula. Astbury siguió trabajando en el estudio de la estructura de proteínas fibrosas, como las queratinas, en lana. Su perseverancia y dedicación lograron que en 1945 consiguiera la primera cátedra de Estructura Biomolecular. Además, fue el primer científico en autodenominarse *biólogo molecular*, aprovechando que en 1938, Warren Weaver había acuñado el término **biología molecular.** El nombramiento de Astbury marcó el nacimiento de la biología molecular como un área de conocimiento independiente.

George Wells Beadle y Edward Lawrie Tatum

En 1941, George Wells Beadle y Edward Lawrie Tatum (figura 1-8), en la Universidad de Stanford, California, encontraron sólidas evidencias de una correlación entre los genes y las enzimas en el hongo *Neurospora crassa*, mediante el estudio de rutas metabólicas implicadas en la síntesis de los aminoácidos. Sus experimentos consistían en exponer a *Neurospora crassa* a rayos X que causaban mutaciones que originaban cambios en las enzimas implicadas en rutas metabólicas. Sus resultados, publicados en 1941, proponían un vínculo directo entre los genes y las enzimas, conocido como la hipótesis "**Un gen, una enzima**". Posteriormente, en 1943, el médico italiano Salvador E. Luria**,** conocido por el medio de cultivo para *E. coli* LB (*Luria broth*), y Max Delbrück demostraron que las mutaciones en *E. coli* ocurrían de forma espontánea, sin necesidad de exposición a agentes mutagénicos, y que éstas se transmitían siguiendo las leyes de la herencia. Estos autores postularon que las mutaciones son las causantes de la resistencia de las bacterias a fármacos. A Luria, Delbrück y Alfred Day Hershey se les otorgó el Premio Nobel de Fisiología en 1963 por sus descubrimientos acerca del mecanismo de replicación de los virus y su estructura genética.

Figura 1-7. William Thomas Astbury.

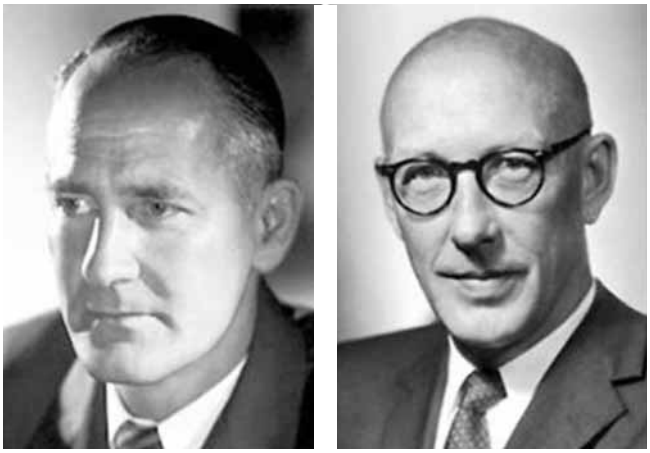


Figura 1-8. George Wells Beadle y Edward Lawrie Tatum.

Oswald Theodore Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty

En 1944, Avery, MacLeod y McCarty (figura 1-9) demostraron que las cepas inocuas de neumococo estudiadas por Griffith se transformaban en patógenas al adquirir la molécula de ADN y no proteínas, como se creyó en un principio, y demostraron así que el *principio transformante* era ADN. MacLeod, empleando refinadas técnicas desarrolladas por él mismo, aisló el principio transformante de muestras de neumococos biológicamente activo. Este compuesto se trató con proteasas (enzimas que degradan proteínas), lipasas (enzimas que degradan lípidos) y glucosidasas (enzimas que degradan carbohidratos), con la finalidad de conocer su naturaleza química. El tratamiento con estas enzimas no logró inactivar su acción. El análisis permitió suponer que el factor transformante podría estar compuesto por ácidos nucleicos, ya que su peso molecular era alto y se precipitaba en presencia de alcohol. El tratamiento con ribonucleasa (enzima que degrada el ARN), tampoco producía su inactivación. Sólo cuando el principio se trataba con desoxirribo-

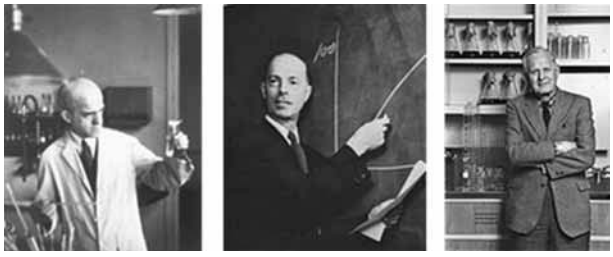


Figura 1-9. Oswald Theodore Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty.

nucleasa (enzima que degrada el ADN) se perdía su acción. De esta manera se demostró que la naturaleza química del principio transformante era ADN y era el causante de producir los cambios permanentes heredables.

Erwin Chargaff

En 1950, Erwin Chargaff (figura 1-10) descubre las leyes que rigen la complementariedad de bases de los ácidos nucleicos. Mediante cromatografía en papel, Chargaff demostró que el ADN aislado de diferentes organismos contiene la misma proporción de Adeninas y de Timinas, así como de citosinas y de guaninas. Asimismo, demostró que el porcentaje de bases purinas era igual al de bases pirimidinas (véase el capítulo 3). Con estos descubrimientos se fundamentó el principio de complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos (figura 1-11).

Esta regla tuvo sentido sólo hasta que James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick propusieron su modelo de la estructura del ADN. En ese mismo año, **lord Alexander Robertus** demostró que los nucleótidos se unían al ADN a través de enlaces fosfodiéster, por lo que propuso una estructura lineal para la cadena de ADN.

Alfred Hershey y Martha Chase

En 1952, Alfred Hershey y Martha Chase (también conocida como Martha C. Epstein; figura 1-12), utilizando bacteriófagos (virus que infectan bacterias) marcados con isótopos radiactivos ^{35}S o ^{32}P (el azufre como elemento químico propio de las proteínas y el fósforo del ADN), demostraron que cuando un virus infecta a una bacteria solamente penetra el ADN viral. La cápside viral no se introduce a la bacteria y, por lo tanto, no participa en la formación de nuevas partículas virales, y concluyeron que el ADN, y no las proteínas, contiene la información genética para la síntesis de nuevos viriones.

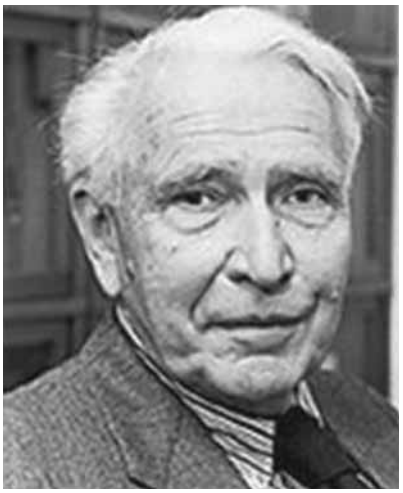


Figura 1-10. Erwin Chargaff.

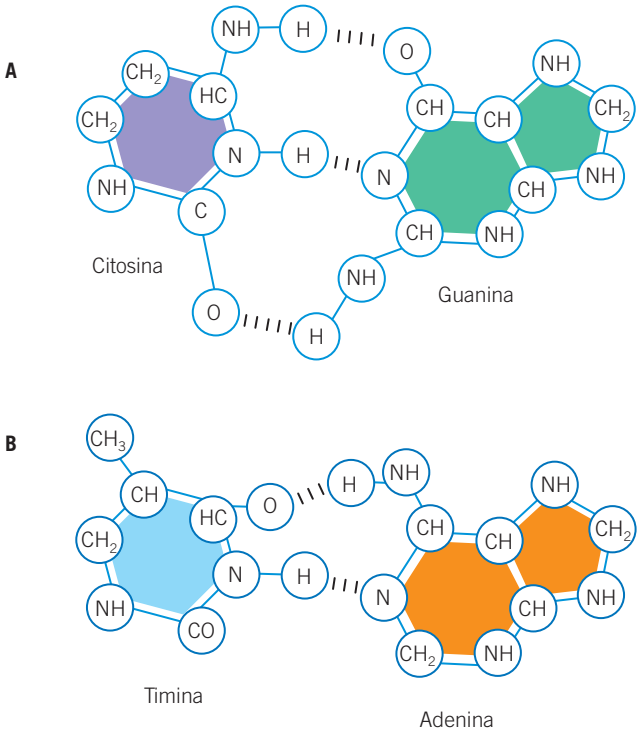


Figura 1-11. Reglas de Chargaff.

Rosalind Franklin

Entre 1950 y 1953, la mayor parte de la comunidad científica comenzaba a admitir que el material genético es el ADN. La quimicofísica Rosalind Elsie Franklin, mediante estudios de difracción de rayos X, descubrió que el ADN presentaba los grupos fosfato hacia el exterior y podía hallarse de dos formas helicoidales distintas: las que hoy conocemos como ADN-A y ADN-B (véase el capítulo 3).

Figura 1-12. Martha Chase y Alfred Hershey.

Figura 1-13. Rosalind Franklin.

James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick

En 1953, el bioquímico estadounidense Watson y el biofísico inglés Crick (figura 1-14) elaboraron el famoso modelo de la doble hélice de ADN, que explicaba de manera clara que el ADN podía duplicarse y transmitirse de una célula a otra. Su maqueta representaba al ADN formado por dos cadenas antiparalelas: una que corre en dirección 5´-3´, y la otra que lo hace en la dirección opuesta 3´-5´ (véase el capítulo 3). Estas cadenas tienen una estructura de α-hélice y se hallan unidas por dos y tres puentes de hidrógeno entre las bases A-T y G-C, respectivamente. En cambio, hacia la parte externa de la cadena se localizan las desoxirribosas, unidas por enlaces fosfodiéster, formando una especie de barandal o pasamanos de una escalera que deja expuestos a los grupos fosfato (figura 1-15).

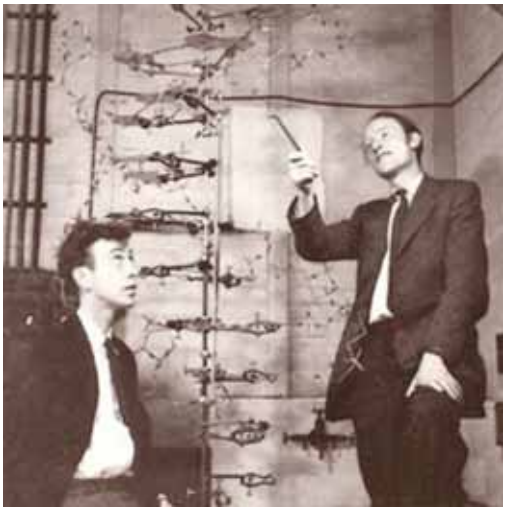


Figura 1-14. James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick.

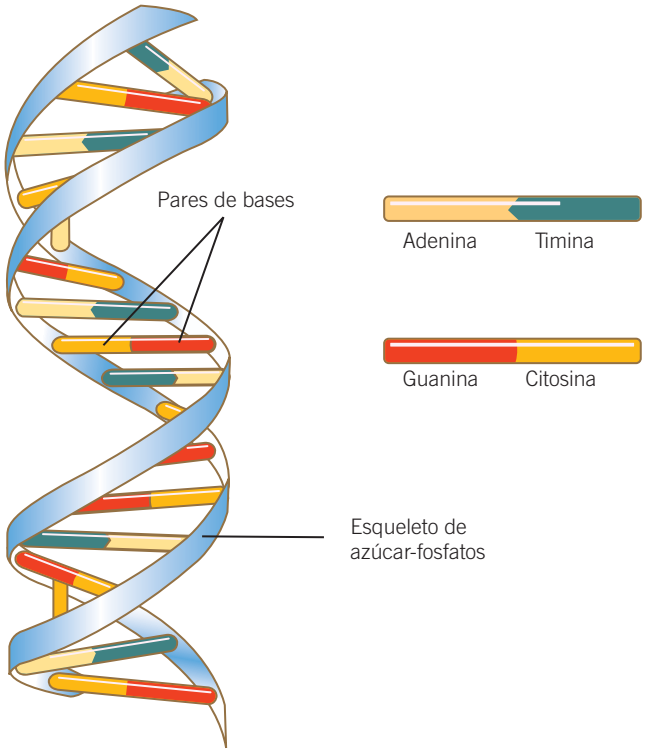


Figura 1-15. Modelo de la doble hélice del ADN.

Era moderna de la biología molecular

El hallazgo de la estructura del ADN es uno de los descubrimientos esenciales en las ciencias de la vida y marcó el inicio de la biología molecular moderna. En 1955, Crick, siguiendo el modelo de la doble hélice, propuso la existencia de la tautomería y la replicación semiconservadora del ADN, y propuso que para la síntesis de proteínas debe existir una molécula mediadora entre las proteínas y el ADN, función que hoy se sabe realiza el ARN. En ese mismo año, propuso el dogma central de la biología molecular: "El ADN dirige su propia replicación y su trascripción para formar ARN complementario a su secuencia; el ARN es traducido en aminoácidos para formar una proteína" (figura 1-16). En 1957 propuso que el código genético debe leerse en tripletes.

Mathew Stanley Meselson y Franklin Stahl

En 1958, Mathew Stanley Meselson y Franklin Stahl (figura 1-17) confirmaron la replicación semiconservadora propuesta por Crick. En su experimento utilizaron centrifugación con gradientes de soluciones de cloruro de cesio (CsCl). Cultivaron bacterias en un medio que contenía el isótopo ^{15}N (pesado) para marcar las cadenas de ADN progenitoras. Después cambiaron el medio por uno que contenía ^{14}N (ligero) y se permitió que las células se replicaran

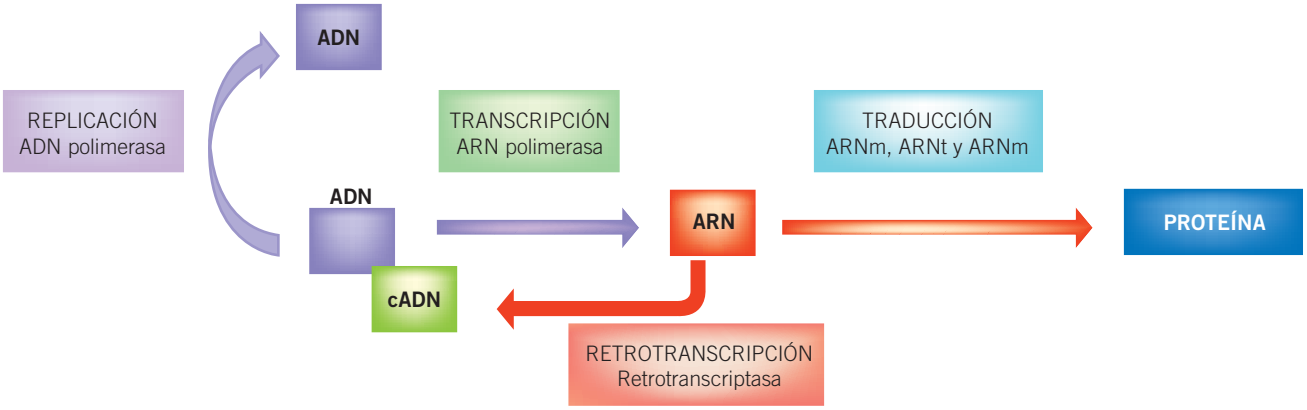


Figura 1-16. Flujo de la información genética.

una sola vez con la finalidad de que el ADN recién replicado incorporara este nitrógeno. Si la replicación del ADN contemplaba la separación de las dos cadenas, era posible predecir la densidad de las moléculas de ADN después de una replicación. Si la replicación fuera semiconservadora, después de una replicación, todas las moléculas de ADN resultantes tendrían que contener una cadena pesada y una ligera, y en consecuencia su densidad sería intermedia. Este resultado fue observado por Meselson y Stahl. Después de dos replicaciones en ^{14}N la mitad de las moléculas de ADN eran ligeras y la otra mitad, híbridas, es decir, con densidad intermedia, justo como lo predice la replicación semiconservadora. De esta manera se demostró que la replicación del ADN es semiconservadora y el nuevo ADN preserva una de las cadenas originales y se sintetiza una *de novo* (figura 1-18).

Hamilton Smith, Daniel Nathans, Werner Arber

En 1968, Steward Lynn y Werner Arber (figura 1-19) descubrieron los sistemas de restricción de las bacterias.

Hamilton Smith, a principios de la década de 1960, en la Universidad de Ginebra, Suiza, descubrió que las bacterias infectadas por virus liberaban unas enzimas (enzimas de restricción), que los inactivan al cortar sus secuencias de ADN. Simultáneamente a este ataque molecular, la bacteria libera otra enzima que modifica químicamente las bases de su propio ADN evitando que la enzima de restricción lo corte, produciendo su autodestrucción. Este proceso en dos pasos se denomina "sistema controlado de restricción-modificación" del hospedero. En 1970, se aísla la primera enzima de restricción *Hind* II, a partir de *Haemophilus influenzae* (véase el capítulo 13).

El enorme potencial del empleo de las enzimas de restricción quedó demostrado por un colega de Smith, Daniel Nathans, de la Universidad Johns-Hopkins, que logró cortar el ADN del virus SV40 (que induce la formación de tumores cancerosos en los simios) a 11 fragmentos. Nathans describió sus genes específicos y, lo que es más importante, las funciones que desempeñan. En 1971, Nathans elaboró el primer mapa de restricción del ADN que detallaba los genes de una molécula de ADN. Un año más tarde, en 1972, Janet Mertz y Ron Davis demostraron que un fragmento de restricción podía insertarse y ligarse a otro ADN cortado por la misma enzima.

Por las excepcionales contribuciones al nacimiento de las técnicas de la ingeniería genética, Arber, Smith y Nathans recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1978.

Howard Martin Temin y David Baltimore

En 1970, Howard Martin Temin, de la Universidad de Wisconsin-Madison, y David Baltimore, del Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT), de manera independiente descubrieron una nueva enzima denominada *transcriptasa inversa* o *retrotranscriptasa*, con función de ADN polimerasa dependiente de ARN. Temin y Baltimore (figura 1-20) demostraron que el genoma de ARN de los retrovirus era copiado a una molécula de ADN de doble cadena por la acción de la transcriptasa inversa, durante la infección de

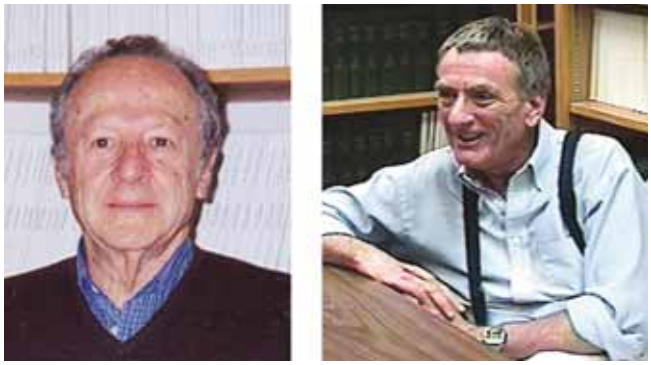


Figura 1-17. Mathew Stanley Meselson y Franklin Stahl.

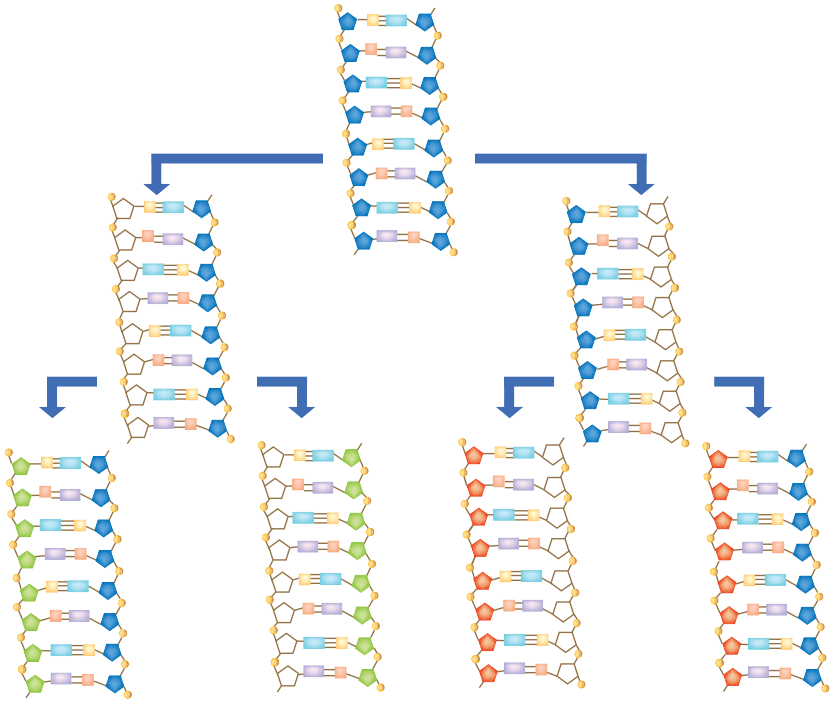


Figura 1-18. Replicación semiconservadora del ADN.

estos virus. Temin y Baltimore, junto con Dulbecco, fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología en 1975.

El principal cuestionamiento acerca de los virus de ARN era si el genoma de estos virus pasaba de padres a hijos como ARN o se integraba al ADN de la célula huésped en alguna etapa de su ciclo viral. Las pruebas de infección y de transformación indicaban que estos virus requerían de la síntesis de ADN. Temin sugirió que la replicación de los virus de ARN ocurría mediante una molécula intermediaria de ADN (un provirus) que servía como molde para la síntesis de ARN viral. Sin embargo, este molde necesita de una ADN polimerasa dependiente de ARN que nunca se había encontrado en ningún tipo de células. Por su parte, Baltimore examinó los viriones (partículas virales maduras) de virus de ARN. Incubó el virus en condiciones en que se indujera la actividad del ADN polimerasa y los cuatro dNTP (ATP, CTP, GTP, TTP), uno de los cuales (TTP) era radiactivo. El producto resultante fue una molécula insoluble en ácido, que mostraba las propiedades del ADN. Este producto era degradado por una DNasa pero no se afectó por la RNasa ni por hidrólisis alcalina (a la cual es sensible el ARN). Sin embargo, si los viriones se trataban con RNasa antes de la reacción, la molécula molde se degradaba. Se observó, también, que la enzima que sintetizaba el ADN se sedimentaba junto con las partículas virales maduras, lo que sugiere que era parte del virus y no de la célula huésped. Estos resultados reforzaron la idea de que el ARN viral se copiaba a una molécula de ADN de doble cadena, que a su vez servía como molde para la síntesis del ARN viral necesario para la infección y la transformación. Estos experimentos no sólo sugirieron que la transformación celular por los virus de ARN ocurría a través de un intermediario

Figura 1-19. Hamilton Smith, Daniel Nathans, Werner Arber.

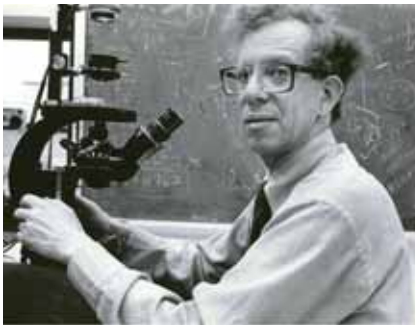


Figura 1-20. Howard Martin Temin y David Baltimore.

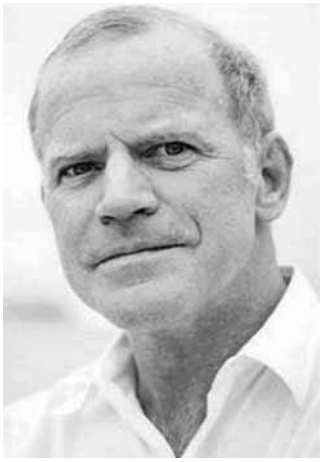


Figura 1-21. Kary Mullis.

de ADN sino que también contradijeron el antiguo concepto del dogma de la biología molecular propuesto por Francis Crick, que postulaba que la información de una célula fluía del ADN al ARN y a la proteína.

Kary Mullis

Kary Banks Mullis (figura 1-21) desarrolló una técnica innovadora que revolucionó la investigación en biología molecular: la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR). En 1985, mientras trabajaba en la compañía Cetus, desarrolló la PCR, que permite la amplificación de una secuencia específica de ADN mediante nucleótidos trifosfatados y un ADN polimerasa. La idea de multiplicar una hebra de ADN millones de veces le surgió en 1983 pero no convenció a sus colegas de la compañía, por lo que tuvo que desarrollarla solo. La versión de la técnica propuesta inicialmente por Mullis, aunque efectiva, era poco eficiente, hasta que se le ocurrió emplear ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos termofílicos, como la *Taq* polimerasa procedente de *Thermus aquaticus* (véase el capítulo 16, sobre PCR) (figura 1-22).

Por esta invención, de gran valor en biotecnología y como herramienta de investigación científica y forense, en 1993 recibió el Premio Japón y el Premio Nobel de Química, compartido con el canadiense Michael Smith. Cetus, la compañía en que trabajaba Mullis, le dio una recompensa de 10 000 dólares por la invención de la PCR y luego vendió la patente por 300 millones de dólares a Roche Molecular Systems. La PCR tiene múltiples aplicaciones, como la identificación de individuos a partir de muestras de sangre o saliva (utilizada en ciencia forense) y la secuenciación de genes de todo tipo de organismos. La secuenciación genética era, hasta entonces, un proceso muy complicado, aplicable sólo cuando se podían obtener de manera natural muchas copias del mismo ADN. La PCR convirtió en una rutina la secuenciación génica y permitió la lectura completa del genoma humano, así como de muchos organismos que se toman como modelos de problemas biológicos en la investigación. La técnica ha permitido también investigar la filogenia (historia evolutiva), mediante la comparación de las secuencias genéticas de distintas especies.

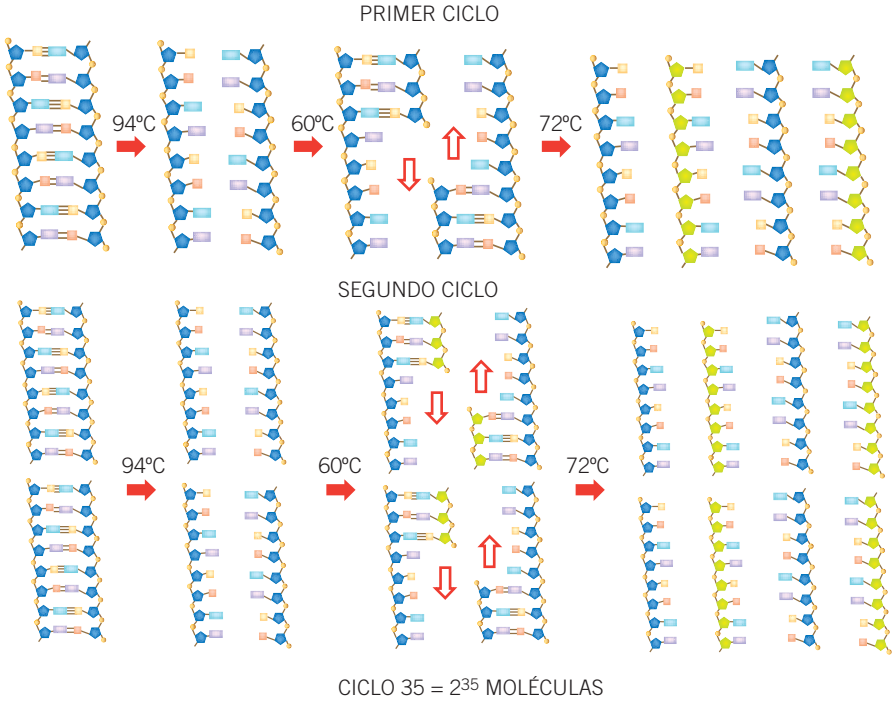


Figura 1-22. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Primer tratamiento de terapia génica con éxito en niños (1989)

En la década de 1980 se propició el advenimiento de la terapia génica, el uso de genes para el tratamiento de enfermedades. Esta estrategia terapéutica se consolidó en 1989, cuando se llevó a cabo el primer protocolo clínico.

El síndrome de inmunodeficiencia combinada grave por déficit de la enzima adenosín deaminasa (ADA) fue la primera enfermedad tratada con terapia génica. Las razones de su elección para este tratamiento son las siguientes:

1. La deficiencia de ADA es la enfermedad congénita de inmunodeficiencia más estudiada, ya que la secuencia del ARNm y del gen que codifica para ADA se identificaron tempranamente (1983).
2. La función de la enzima está perfectamente dilucidada.
3. La producción de tan sólo el 10% de los niveles normales de la enzima ADA es suficiente para establecer una función inmune en el paciente. Por el otro lado, la sobreproducción de ADA superior a 50 veces los valores normales sólo ocasiona una ligera anemia hemolítica.
4. Se ha demostrado que las células genéticamente corregidas tienen una ventaja selectiva en cuanto al crecimiento frente a las células no modificadas.

En este estudio se incluyó a dos pacientes, uno de cuatro años y otro de nueve. Antes de incluirse en el ensayo se había demostrado que estos niños tenían una respuesta incompleta al tratamiento con reemplazamiento enzimático y no había ningún donante de médula ósea compatible.

Se les realizó una extracción de sangre y se aislaron por aféresis los linfocitos T periféricos, que se estimularon con interleucina-2 (IL-2) y anticuerpos anti-CD3 durante 72 h y se transdujeron con un vector retroviral que contenía el gen *ADA*. Se cultivaron durante 9 a 12 días y posteriormente se reincorporaron al paciente (véase capítulo de terapia génica). Los pacientes recibieron 10 a 12 infusiones durante dos años. Como resultado, la función inmunológica de ambos llegó a niveles mucho más altos que durante el periodo de tratamiento con sustitución enzimática, y se mantuvieron estables dos años después del último tratamiento. Ambos pacientes tuvieron una respuesta variable a los antígenos, mantuvieron un crecimiento normal de linfocitos T y tuvieron el mismo tipo de infecciones que los demás niños de su edad. Los efectos adversos asociados a esta terapia fueron mínimos.

Proyecto del Genoma Humano (1990)

El Proyecto del Genoma Humano (PGH) fue un proyecto internacional de investigación científica con el objetivo fundamental de determinar la secuencia de pares de bases que componen el ADN e identificar los aproximadamente 30 000 genes del genoma humano, desde un punto de vista físico y funcional. El debate público que suscitó la idea captó la atención de los responsables políticos de muchos países, no sólo porque el PGH suponía un gran reto técnico-científico, sino también por las tecnologías de vanguardia que podían surgir, así como porque el conocimiento obtenido podría asegurar la superioridad tecnológica y comercial del país que lo desarrollara. Se nombró responsable del proyecto a James D. Watson (uno de los dos investigadores que propusieron el modelo de la doble hélice del ADN en 1953). En 1990 se inauguró definitivamente el PGH y se calcularon 15 años de trabajo. En una primera etapa, la elaboración de mapas genéticos exigió el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación para poder abordar todo el genoma. Para su desarrollo se destinó un presupuesto de 3000 millones de dólares y se calculó que iba a terminar en 2005.

En 2001 se elaboró y publicó el primer borrador del genoma. En abril de 2003 se publicó la secuencia completa del genoma humano, dos años antes de lo previsto. Las conclusiones obtenidas al finalizar este proyecto fueron las siguientes:

- El genoma humano está constituido por 3000 millones de pares de bases.
- Existen 25 000 genes codificantes.
- La homología en la secuencia de ADN entre individuos es del 99.99%.
- La especie más cercana filogenéticamente al ser humano es el chimpancé, con 99.9% de homología en su secuencia de ADN.

Clonación del primer mamífero (1997)

La oveja *Dolly*, que vivió del 5 de junio de 1996 al 2 de enero de 2003, fue el primer mamífero clonado a partir de una célula adulta. Sus creadores fueron Ian Wilmut y Keith Campbell, científicos del Instituto Roslin de Edimburgo (Escocia). *Dolly* fue una oveja resultado de una transferencia nuclear desde una célula donante diferenciada (de glándula mamaria) a un óvulo no fecundado y anucleado. Cinco meses después nacía *Dolly*, la única cría resultante de 277 fusiones de óvulos anucleados con núcleos de células mamarias.

Dolly vivió siempre en el Instituto Roslin, donde fue estudiada conforme envejecía. Demostró ser fértil y tuvo crías en tres ocasiones. A los cinco años de edad, *Dolly* desarrolló enfermedades crónico-degenerativas propias de individuos seniles, como artritis (figura 1-23).

A pesar de que la expectativa de vida de la raza Finn Dorset, a la que pertenecía *Dolly*, es de 11 a 12 años, tuvo que ser sacrificada debido a una enfermedad progresiva pulmonar a los ocho años de edad. La necropsia demostró que tenía cáncer de pulmón, causado por un retrovirus. Los técnicos de Roslin no han podido certificar si hubo conexión entre su muerte prematura y el hecho de ser un clon, pues otras ovejas del mismo rebaño sufrieron la misma enfermedad y murieron a causa de ella. Sin embargo, algunos autores han especulado que había un factor agravante en la muerte de *Dolly*: al nacer tenía una edad genética de seis años, la misma edad de la oveja de la cual fue clonada. Esta aseveración se sustenta en el hallazgo de que los telómeros de su ADN eran cortos, característica presente en células viejas.

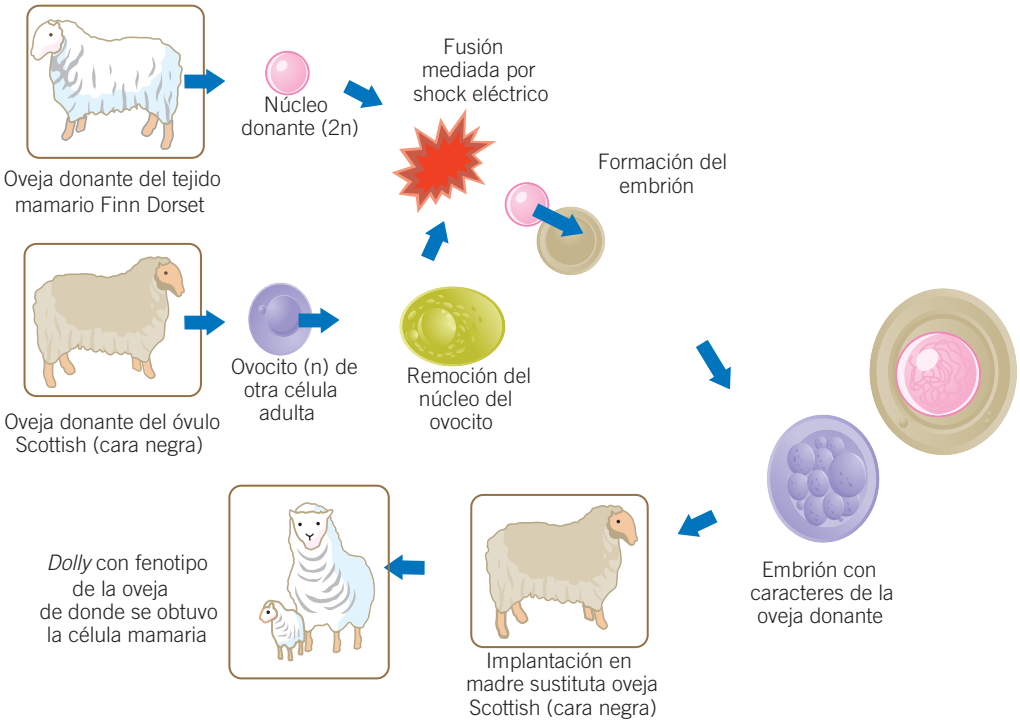


Figura 1-23. Clonación de la oveja *Dolly*.

Ejercicios de integración

1. Complete la información que corresponde en los recuadros vacíos.

Nombre	Aporte (experimento)	Características	Año
Gregor Mendel	Leyes fundamentales de la herencia.		1865
Temin y Baltimore		Se demuestra cómo los virus con ARN como genoma sintetizan ADN y se replican.	
	Principio transformante.	Explica cómo una cepa avirulenta puede transformarse en una virulenta.	
Erwin Chargaff			1950
Watson y Crick	Elaboran el modelo de la doble hélice de ADN.		
	Desarrolla la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	Permite la amplificación de una secuencia específica de ADN mediante nucleótidos trifosfatados y un ADN polimerasa termoestable.	
		Con el uso de ^{14}N y ^{15}N comprueban que el ADN se replica de manera semiconservadora.	1958

2. De acuerdo con los experimentos del principio transformante de Griffith, complete la información que corresponde en los recuadros vacíos.

Cepa	Experimento	Resultado
Cepa *S*		El ratón muere.
	Inyectada al ratón.	El ratón vive.
Cepa *S*	Tratada con calor e inyectada al ratón.	
Cepa *S*	Tratada con calor, incubada con cepa *R* e inyectada al ratón.	

Bibliografía

Griffith F. The significance of *pneumococcal* types. *J Hyg,* 1928;27:113-159.

Karp G. *Biología celular y molecular, conceptos y experimentos,* 4ª ed. México, DF: McGraw-Hill, 2006.

Luque J., Herráez A. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética,* 1ª ed. Madrid: Elsevier, 2001.

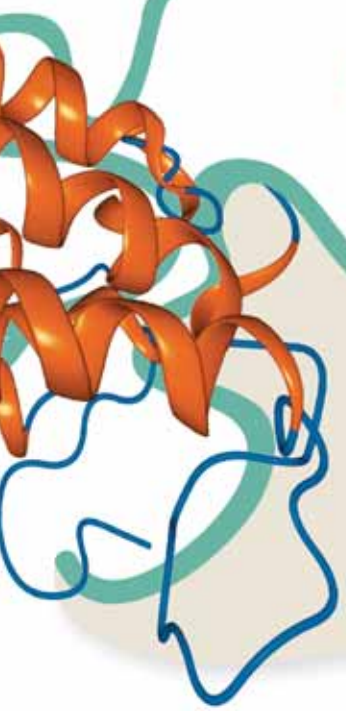
Meselson M, Stahl F.W. The replication of DNA in *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci,* 1958;44:671-682.

Mullis K.B. Reacción en cadena de la polimerasa. Investigación y Ciencia. 1990;165:30-37.

Venter J.C., Adams M.D., Myer E.W,. *et al.* The sequence of the human genome. *Science,* 2001;291:1304-1351.

Watson J.D. *Biología Molecular del gen,* 5ª ed. Madrid: Médica Panamericana, 2006:7-46.

Watson J.D, Crick F.H.C. A structure for deoxyribose nucleics acids. *Nature,* 1953;171:737-738.



Capítulo 2

Ciclo celular

Blanca Estela Alcántar Díaz / Luis Daniel Hernández Ortega
Adriana María Salazar Montes

Introducción

En 1858, Rudolf Virchow estableció lo que puede considerarse el segundo principio de la teoría celular: "Toda célula procede de otra célula preexistente por división de ésta" (*omnis cellula e cellula*). Por esto, se considera que la célula es la unidad de origen de todos los seres vivos.

Para que esta acción pueda llevarse a cabo es necesario que la célula pase por un proceso denominado *división celular*. En los organismos unicelulares, como las bacterias y las levaduras, cada división celular produce un organismo nuevo completo, mientras que para dar origen a un organismo pluricelular como el ser humano, a partir de un cigoto (originado por la unión de dos gametos sexuales), se necesitará una gran cantidad de divisiones celulares. Sin embargo, éstas no se detienen una vez que el organismo está completo, sino que continúan durante toda la vida del individuo y son necesarias para reponer las células muertas o senescentes, así como en situaciones de traumatismo o lesión.

El ciclo celular

El ciclo celular representa el mecanismo fundamental subyacente a la reproducción de todos los seres vivos, y se divide en etapas, a través de las cuales la célula pasa de una división celular a la siguiente. Estos acontecimientos se realizan mediante una secuencia ordenada de procesos en los que la célula duplica su contenido y luego se divide en dos.

El ciclo celular se divide en dos fases principales: la **fase M,** o fase mitótica, y la **interfase**, o periodo preparatorio. La **fase M**, a su vez, se subdivide en **mitosis**, en la cual los cromosomas duplicados se dividen en dos núcleos, y **citocinesis**, donde toda la célula se divide en dos células hijas. Por otra parte, la interfase se subdivide en: **fase G_1, fase S** y **fase G_2**. Durante la **interfase** varía el grado de condensación del material genético así como el contenido de ADN, sin modificarse el número de cromosomas, mientras que la fase M suele durar aproximadamente 1 h en las células de mamíferos (figura 2-1). La interfase puede tener una duración de días, semanas o incluso más tiempo, según el linaje celular y las condiciones ambientales o fisiológicas imperantes (figura 2-2).

De acuerdo con su potencial proliferativo, las células pueden categorizarse en:

Células lábiles, que en condiciones normales tienen una alta actividad mitótica. Se encuentran en tejidos que se renuevan constantemente (por ejemplo, el revestimiento epitelial de las cavidades y la superficie corporal, los precursores hematopoyéticos en la médula ósea y las espermatogonias, que dan origen a los espermatozoides).

Células estables, que en condiciones normales no se dividen, pero cuya división puede inducirse mediante el estímulo apropiado. Estas células renuevan de manera lenta los tejidos menos expuestos, pero pueden aumentar la velocidad de renovación en caso de pérdida tisular, como sucede con el hígado, los túbulos renales proximales y las células endoteliales de vasos sanguíneos.

Células permanentes, que carecen de la capacidad de división. Son células totalmente diferenciadas, muy especializadas, incapaces de entrar nuevamente al ciclo celular; un ejemplo representativo son los eritrocitos, que se originan de su precursor y pasan por un proceso de maduración en el cual pierden su núcleo y con ello su capacidad de división.

Una visión global del ciclo celular permite observar cómo la célula transcurre de manera ordenada y sin discontinuidad por dos grandes etapas bien diferenciadas: la **fase M** (mitosis en células somáticas y meiosis en células germinales) y la **interfase** (común en ambas).

Durante esta etapa, la célula se prepara para la siguiente división y duplica su material genético, es decir el ADN, y todo su contenido (proteínas, ARN, organelos, membra-

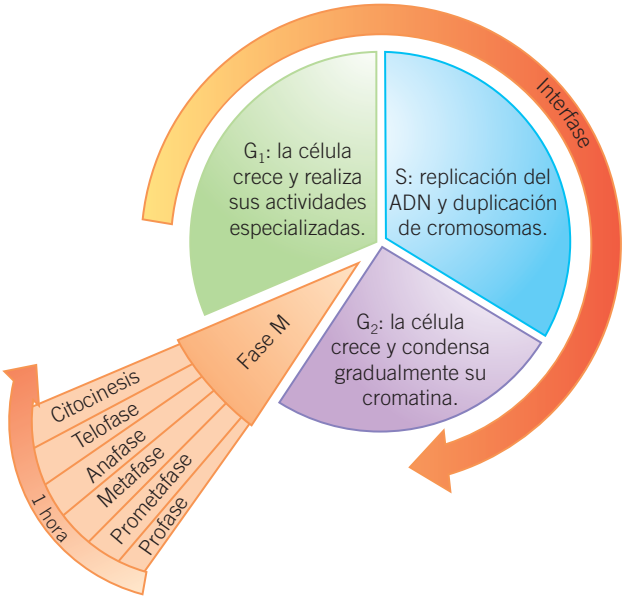


Figura 2-1. Fases del ciclo celular. El ciclo celular se divide en dos fases: interfase y M. La fase M, a su vez, incluye mitosis y cariocinesis, mientras que la interfase incluye las fases G_1, S y G_2; la fase M tiene una duración aproximada de una hora en las células de mamíferos, mientras que la interfase puede tener una duración de días, semanas o incluso más tiempo.

nas), de manera que duplica su tamaño antes de dividirse en dos células hijas.

La mayor parte de la vida celular, ya sea en la interfase o en quiescencia (reposo), la molécula de ADN no está presente en la forma extendida de doble hélice ni tampoco en la forma compacta de cromosomas, sino en un estado parcialmente condensado conocido como **cromatina**.

El ciclo celular transcurre entre dos divisiones celulares sucesivas; se divide en cuatro fases, con una duración desigual, que se exponen a continuación.

Fase de descompactación (G_1)

Tras la mitosis, la célula entra en la fase G_1 (G, de *gap*, "intervalo"), durante la cual se dedica a sus actividades especializadas. La principal diferencia entre las células de división rápida y las de división lenta es la duración de la fase G_1, que proporciona tiempo adicional de crecimiento.

De las tres etapas de la interfase, la G_1 es la más variable. Con notables excepciones, las células que han detenido su división de manera transitoria o permanente, en el cuerpo o en el medio de cultivo, se encuentran en una etapa previa al inicio de la síntesis de ADN.

Durante la fase G_1, las células mantienen un número constante de cromosomas diploides (2n) y su contenido en el ADN no está duplicado, por lo que se afirma que equivale a 2c (dos copias). La cromatina se descondensa de forma gradual hasta adoptar una conformación totalmente extendida (correspondiente a la doble hélice), necesaria para la separación de las dos hebras en la siguiente fase. En este periodo la célula determina si las condiciones ambientales e internas son adecuadas para la división celular.

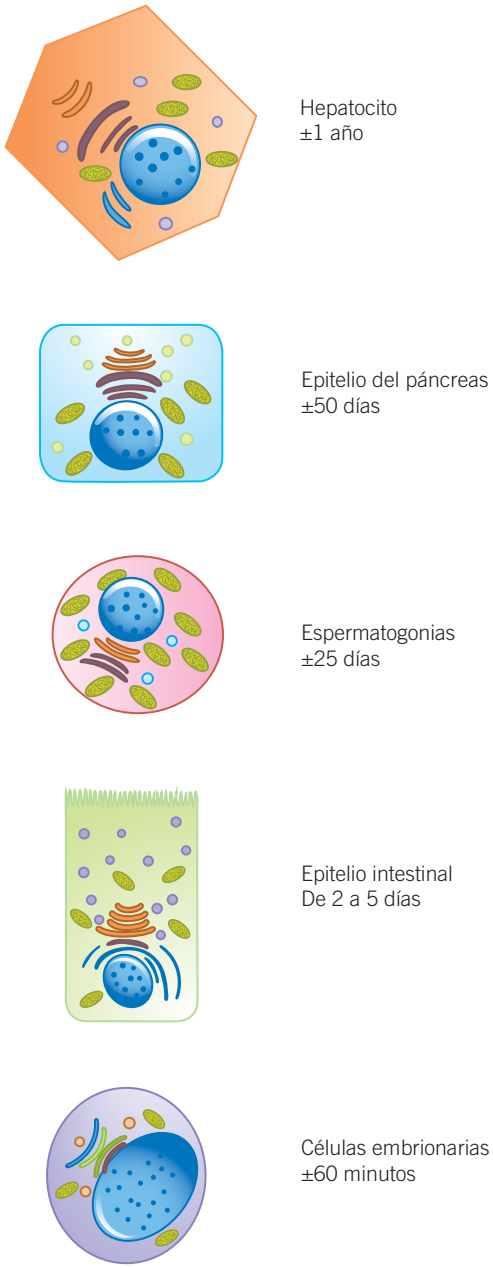


Figura 2-2. Duración del ciclo celular. El ciclo celular tiene diferente duración. En la figura puede observarse la duración del ciclo celular en diferentes estirpes celulares; en hepatocitos la duración es de aproximadamente un año, aunque con un estímulo (pérdida o daño tisular) el tiempo se acorta. Las células embrionarias tienen etapas G_1 y G_2 muy cortas, por lo que se dice que pasan de S a M, y viceversa, sin pasar por G_1 y G_2, lo que acelera la velocidad de división.

En el caso de que las condiciones sean favorables, la célula atraviesa el punto de **inicio** (*start*) que compromete de forma irreversible el comienzo del ciclo celular. Si las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, la célula puede repetir el ciclo varias veces más.

Fase de duplicación o síntesis (S)

En la fase S, o de síntesis, se produce la replicación del ADN de los cromosomas individuales. Cada hebra de este ADN sirve de molde para la síntesis o producción de la hebra nueva, que permanece asociada por apareamiento de bases. Las dos moléculas de ADN resultantes permanecen unidas por el centrómero, con lo que dan lugar a cromosomas con cuatro hebras de ADN. Cada doble hebra constituye una cromátida; de esta forma el número de cromosomas es constantemente diploide en el núcleo (2n), pero el contenido de ADN se duplica de dos copias (2c) hasta cuatro (4c).

Las dos copias de cada cromosoma replicado permanecen íntimamente unidas entre sí como cromátidas hermanas idénticas. Éstas se mantienen juntas debido a complejos proteicos denominados *cohesinas*, que se ensamblan a lo largo de cada una de ellas a medida que el ADN se va replicando. La cohesión de las cromátidas es fundamental para la segregación adecuada de los cromosomas, misma que desaparece en la fase tardía de la mitosis, para permitir la separación de las cromátidas hermanas. Al terminar la replicación, la célula entra en la fase G_2.

Fase de preparación para la división de la cromatina (G_2)

En la fase G_2 la célula verifica si se ha completado la fase S de forma correcta y decide entre permitir el paso a mitosis, o en caso contrario, esperar a que se realicen las reparaciones necesarias.

En la fase G_2 se inicia la condensación gradual de la cromatina (proceso inverso a la fase G_1 o de descondensación), que se completa en las primeras etapas de la mitosis, lo que da lugar a cromosomas visibles al microscopio, con un aspecto típico de dos cromátidas y cuatro brazos. Aunque puede considerarse que cada molécula de ADN es un cromosoma en cualquier momento del ciclo, el término *cromosoma* corresponde estrictamente a esta forma de máxima condensación. En cambio, los términos *cromosoma metafásico* y *cromosoma interfásico* se utilizan para referirse a las formas de la cromatina condensada y descondensada, respectivamente.

Fase de compactación o división (M)

La **fase M** es, en sí, un proceso continuo, que para su estudio se divide en seis etapas. Las primeras cinco (profase, prometafase, metafase, anafase y telofase) constituyen la **mitosis**, que originalmente se definió como el periodo en el que los cromosomas se condensan visiblemente. La citocinesis se produce en la sexta etapa, que se superpone con el final de la mitosis. En conjunto, estas etapas constituyen una secuencia dinámica en la que varios ciclos independientes se desarrollan de forma coordinada para producir dos células hijas genéticamente idénticas y en las que participan los cromosomas: el citoesqueleto y los centrosomas.

Cuando la célula está por ingresar en la fase M, los cromosomas replicados se condensan y se visualizan como estructuras filiformes; un conjunto de complejos proteicos denominados condensinas ayudan a producir esta condensación. Las cohesinas y las condensinas están relacionadas de forma estructural y trabajan en conjunto para ayudar a configurar los cromosomas replicados para la mitosis. Las cohesinas se unen a dos moléculas paralelas de ADN (cromátidas hermanas idénticas) y las mantienen juntas, en tanto que las condensinas se unen a una molécula individual de ADN para ayudar a condensarla.

Antes de que comience la fase M tienen que completarse dos eventos básicos: el ADN tiene que replicarse totalmente y en las células animales debe duplicarse el centrosoma. El centrosoma es el principal centro organizador de los microtúbulos, que en las células animales debe duplicarse para poder contribuir a la formación de los dos polos del huso mitótico, que luego separarán los cromosomas duplicados y los distribuirán en las dos células hijas, que deberán tener su propio **centrosoma.**

En las células animales el centrosoma también contiene un par de centríolos, cada uno constituido por una estructura cilíndrica de microtúbulos cortos.

Durante la interfase de cada ciclo de una célula animal, el centrosoma se duplica, y ambas copias permanecen juntas como un complejo único a un lado del núcleo. Cuando se inicia la mitosis, los dos centrosomas se separan y cada uno origina una estructura radial de microtúbulos denominada ***áster***. Los dos ásteres se desplazan en direcciones opuestas del núcleo para formar los dos polos del huso mitótico; cuando se rompe la envoltura nuclear el huso captura los cromosomas y finalmente los separa en una fase más tardía de la mitosis. Cuando la mitosis termina y la envoltura nuclear se reconstituye alrededor de los cromosomas separados, cada célula hija recibe un centrosoma junto con sus cromosomas. El proceso de duplicación y separación del centrosoma se conoce como ***ciclo del centrosoma.***

Mitosis

El eje central de la mitosis consiste en separar y distribuir de manera equitativa los cromosomas, ya replicados en la fase S que le precede, con la finalidad de que cada célula hija reciba una copia idéntica del genoma. Ésta es una etapa del ciclo celular en la que la célula cesa la mayor parte de sus actividades metabólicas y presenta una falta relativa de respuesta a estímulos externos, debido a que dedica toda su

energía a la separación cromosómica. La mitosis, a su vez, se subdivide en cinco fases, llamadas *profase, prometafase, metafase, anafase* y *telofase*, acompañadas de un proceso denominado *citocinesis*, en el cual la célula en división se separa en dos.

Profase

Durante la profase los cromosomas replicados se condensan y se preparan para separarse, y el huso mitótico comienza a formarse afuera del núcleo. La envoltura nuclear se rompe, el citoesqueleto se desensambla, el complejo de Golgi y el retículo endoplásmico se fragmentan, y la envoltura nuclear se dispersa, lo que marca el inicio de la prometafase.

Prometafase

En esta fase se forma el huso mitótico definitivo que permite a los microtúbulos del huso entrar en contacto con los cromosomas, mismos que se mueven a una posición en el centro de la célula.

Metafase

En la metafase los cromosomas se encuentran alineados en el ecuador del huso, con una cromátide de cada cromosoma conectada a un polo opuesto. El plano de alineación de los cromosomas se conoce como *placa de la metafase*. El huso mitótico de la célula en metafase se encuentra altamente organizado para separar los cromosomas duplicados. Los microtúbulos del huso en esta fase tienen la misma polaridad pero funcionalmente se dividen en tres grupos: *1*) microtúbulos astrales, que irradian hacia fuera a partir del centrosoma en la región situada por fuera del cuerpo del huso, y es probable que ayuden en la colocación del aparato del huso dentro de las células y determinen el plano de la citocinesis; *2*) microtúbulos cromosómicos, que se extienden desde el centrosoma hacia una estructura proteica localizada en el centrómero del cromosoma, que permite el anclaje de los microtúbulos del huso a los cromosomas y se denomina *cinetocoro*; este proceso es necesario para el desplazamiento de los cromosomas hacia los polos durante la anafase, y *3*) microtúbulos polares (o interpolares), que se extienden desde el centrosoma hasta pasar los cromosomas y forman una canastilla estructural que mantiene la integridad del huso.

Las dos cromátides hermanas de cada cromosoma replicado se comprimen una contra otra a lo largo de las superficies internas y aparentemente se mantienen juntas por unas proteínas de "pegamento" no cromosómicas denominadas *cohesinas*.

Anafase

Ésta se inicia cuando se separan en forma sincrónica y súbita las cromátides hermanas, y se acompaña de la liberación de la proteína "pegamento" dentro del citoplasma; todos los cromosomas de la placa metafásica se separan de manera sincronizada, y las cromátides (ahora conocidas como cromosomas, pues ya no se encuentran fijas a su duplicado) inician su migración hacia los polos. El movimiento de cada cromosoma hacia un polo se acompaña del acortamiento de los microtúbulos fijos al cinetocoro.

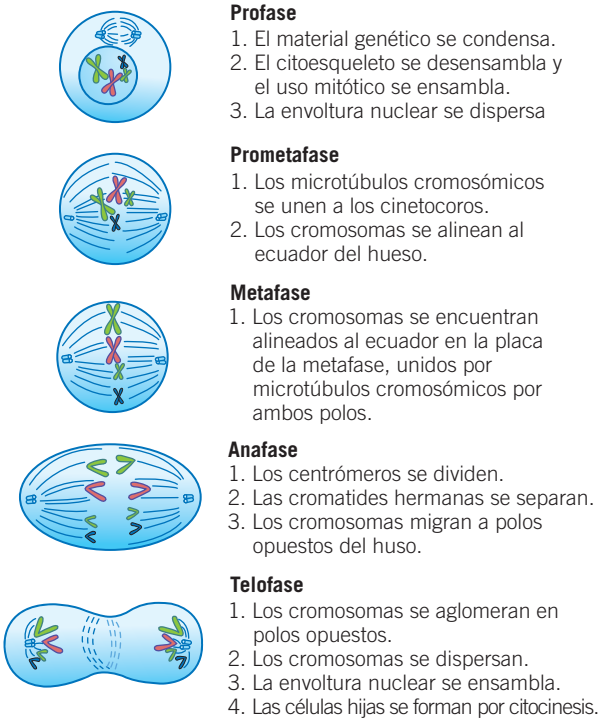


Figura 2-3. Fases de la mitosis. La mitosis está conformada por varias etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. En este esquema pueden observarse las características de cada una de ellas en relación con los cambios experimentados por el material genético y la célula en general.

Telofase

Durante la telofase los cromosomas se acercan a sus respectivos polos y tienden a reunirse en una sola masa marcando el inicio de esta etapa final de la mitosis. La envoltura nuclear se reconstituye conforme las vesículas membranosas se unen a la superficie de los cromosomas y luego se fusionan lateralmente para formar una cubierta de doble membrana cada vez más grande. La envoltura nuclear reconstituida se acomoda alrededor de cada uno de los dos conjuntos de cromosomas separados para formar dos núcleos (figura 2-3).

Citocinesis o citodiéresis

La división del citoplasma se inicia al final de la anafase y continúa durante la telofase.

La citocinesis, o citodiéresis, es la separación física del citoplasma en dos células hijas durante la división celular y se produce después de la cariocinesis, al final de la telofase. El mecanismo de las células animales y el de las vegetales es distinto. En las células animales tiene lugar por estrangulación de la célula en el ecuador del huso, y se lleva a cabo mediante la participación de proteínas ligadas a la membrana (actina y miosina), que forman un anillo contráctil.

El primer indicio de citocinesis en animales se observa durante la anafase tardía como una depresión en la superficie de la célula dentro de una banda estrecha alrededor de ésta. Conforme avanza el tiempo, la indentación se profundiza y se convierte en un surco que rodea por completo a la célula. El plano del surco se sitúa en el mismo plano que ocupaban previamente los cromosomas de la placa de la metafase; en otras palabras, el plano del surco es perpendicular al eje del huso mitótico, lo que garantiza que los dos conjuntos de cromosomas se separen finalmente en dos células. El surco continúa profundizándose hasta que las superficies opuestas hacen contacto en el centro de la célula y ésta se separa en dos. Este proceso se lleva a cabo por el impulso de contracciones progresivas causadas por un anillo periférico contráctil.

Las células vegetales tienen un proceso diferente de división que consiste en la acumulación de vesículas procedentes del aparato de Golgi, que contienen elementos de la pared celular, en la zona media de la célula. Las vesículas se fusionan y entran en contacto con las paredes laterales de la célula. De esta forma se origina el tabique o fragmoplasto, que hará posible la división celular (figura 2-4).

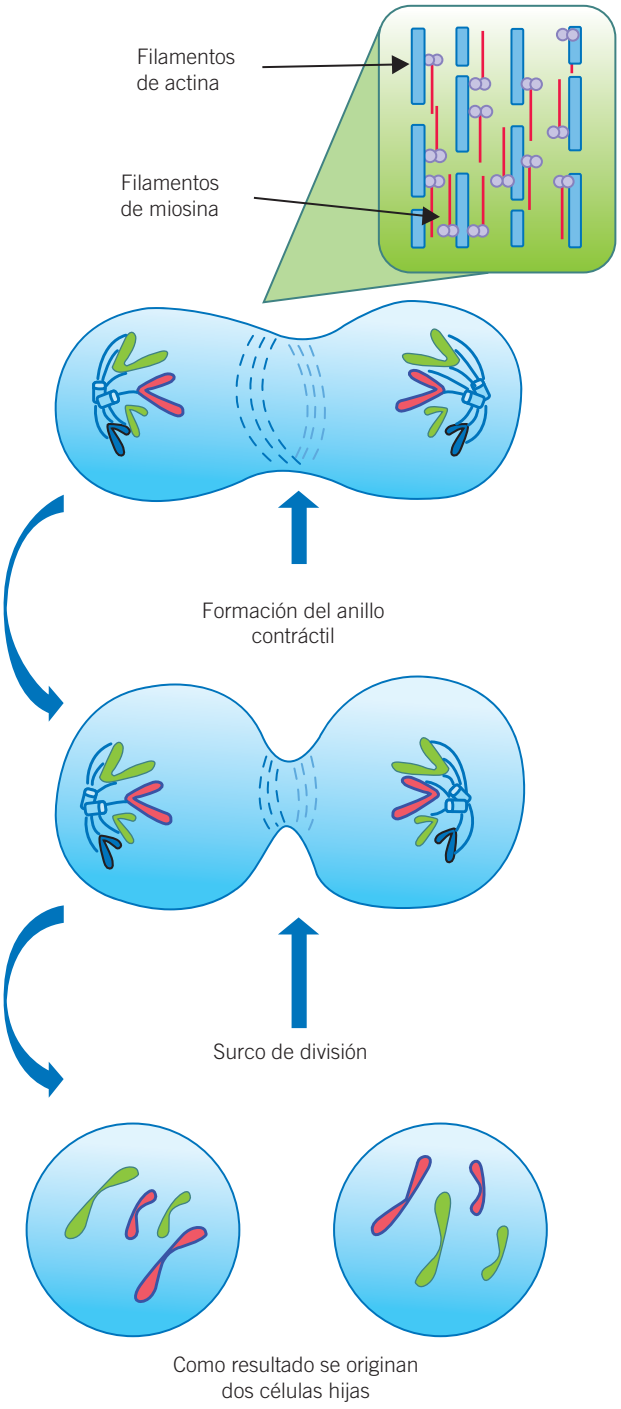


Figura 2-4. Citocinesis. La formación del anillo contráctil se produce durante la etapa de citocinesis. Dicho anillo es el encargado de estrangular el citoplasma de la célula hasta dividirla en dos. La composición del anillo contráctil es principalmente de filamentos de actina y miosina.

Fase G_0 o de quiescencia

Algunas células permanecen en reposo tras la fase M, que puede ser una etapa transitoria, durar largo tiempo o no dividirse definitivamente, a menos que se estimulen para ello. En el cuerpo o en un medio de cultivo se encuentran "detenidas", y cuando se produce un estímulo adecuado, o si las condiciones ambientales son las idóneas, pueden proseguir a la fase G_1 del ciclo y continuar hasta la mitosis.

Control del ciclo celular

En el control del ciclo celular participan complejos de proteínas que actúan en cada una de las etapas y permiten, o no, el avance del ciclo. Estas proteínas se denominan *ciclinas* y *cinasas dependientes de ciclinas* (Cdk), que se unen formando complejos de dos subunidades: una posee actividad cinasa y transfiere grupos fosfato del adenosín trifosfato (ATP) a residuos serina y treonina de proteínas diana o blanco, implicadas en la progresión del ciclo celular, y la otra actúa como una subunidad reguladora llamada *ciclina.* Cuando la concentración de ciclina es baja, la cinasa permanece inactiva, pero si la concentración de ciclina se eleva, la cinasa se activa y la célula avanza dentro del ciclo celular**.** Debido a esto a las enzimas con actividad cinasa se las denominó Cdk, y se descubrió que dirigen diversas actividades durante el ciclo celular.

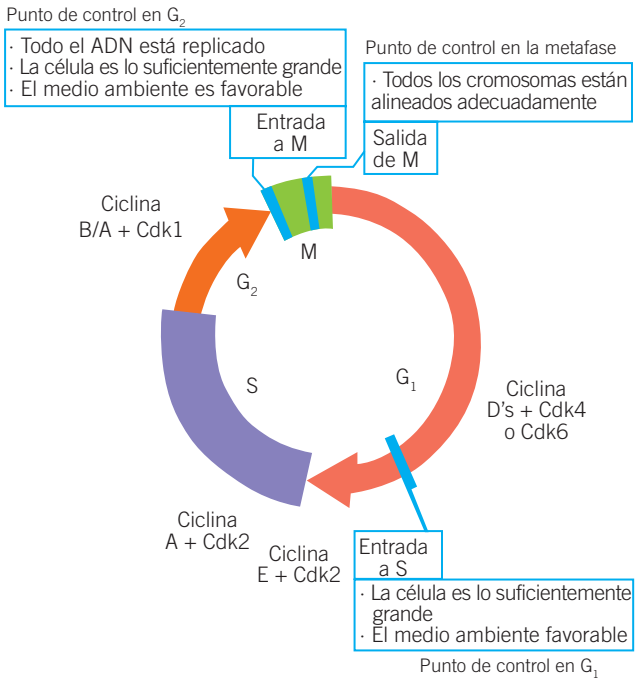


Figura 2-5. Regulación del ciclo celular. En este esquema se presenta la ubicación de los principales puntos de control que regulan el ciclo celular. El paso de una etapa a otra está regulado por complejos ciclina-cinasa. La actividad de Cdk en G_1 temprana es muy baja, pero se incrementa conforme avanza la fase. También se observa actividad de Cdk4 y Cdk6 acopladas a las ciclinas D (D_1, D_2 y D_3). El principal sustrato de estas Cdk es la proteína reguladora Rb; su fosforilación conlleva la transcripción de varios genes como los que codifican para las ciclinas E y A, Cdk1 y varias proteínas que participan en la replicación. El paso de la fase G_1 a S, es impulsada por la actividad de la Cdk2 con ciclina E y ciclina A. La transición de G_2 a M comienza con la activación de la ciclina A y Cdk1, además de los complejos ciclina B1-Cdk1, los cuales se cree que fosforilan sustratos como proteínas citoesqueléticas, histonas y proteínas de la envoltura nuclear.

Estudios en levaduras permitieron observar que el ciclo celular en una célula eucariota se regula en distintas etapas. El primer punto de transición, denominado START, ocurre antes del final de G_1. Una vez que la célula ha pasado este punto, está destinada en forma irrevocable a replicar su ADN y a completar el ciclo celular. El paso por START requiere la activación de Cdk por una o más ciclinas G_1, cuyos niveles se elevan al final de G_1.

El paso de G_2 a la mitosis requiere de la activación de Cdk por un grupo diferente de ciclinas, las *ciclinas mitóticas*. A este complejo se lo denomina *factor promotor de la mitosis* (MPF), y se encarga de fosforilar los sustratos necesarios para que la célula inicie la mitosis. La salida de la mitosis y el ingreso a G_1 depende de un descenso rápido en la actividad de Cdk, consecuencia de una caída en la concentración de ciclinas mitóticas.

Puntos de revisión (*check points*)

Los puntos de revisión son mecanismos que detienen la progresión del ciclo celular en caso de que cualquier ADN cromosómico se dañe o si ciertos procesos no se llevaron a cabo de manera correcta, como la replicación del ADN en la fase S o la alineación cromosómica durante la fase M.

En estos puntos participan proteínas que, a manera de sensores, reconocen el daño en el ADN y las anormalidades celulares. Si una de estas proteínas detecta un defecto, inicia una respuesta que detiene de forma transitoria el progreso del ciclo celular. Entonces la célula puede reparar el daño o corregir el defecto antes de ingresar a una nueva etapa. En caso de que el daño sea mayor y no sea posible repararlo, el mecanismo de revisión transmite una señal que conduce a la muerte de la célula dañada. Los principales puntos de control se encuentran ubicados en G_1 antes de la síntesis de ADN, en G_2 antes de la mitosis y en la mitosis durante la metafase (figura 2-5).

Dos de las principales proteínas que funcionan como sensores en estos puntos de control son ATM (ataxia-telangiectasia mutada) y ATR (proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3), que son parte de complejos multiproteicos capaces de unirse al ADN dañado. ATM es el principal mediador de la respuesta a las roturas de ambas cadenas del ADN, un tipo de daño característico de las radiaciones ionizantes, mientras que ATR interviene en respuesta al daño inducido por radiación ultravioleta (UV). Una vez unidas pueden fosforilar una variedad de proteínas que participan en los puntos de revisión del ciclo celular.

Otro tipo de proteínas con capacidad de regular el ciclo celular son las conocidas como *proteínas supresoras de tumores*. Entre las más importantes se encuentran Rb (proteína del retinoblastoma) y p53. Rb se encarga de detener la célula en la fase G_1, contiene pocos aminoácidos fosforilados, e impide la entrada a la fase S al unirse al factor de transcripción E2F, evitando que éste se asocie a secuencias potenciadoras en sus genes blanco. A medida que avanza el ciclo celular, Rb se hiperfosforila de manera progresiva, lo que provoca que Rb se desprenda de E2F, y le permite comenzar la síntesis de ADN. Por otra parte, p53 desempeña su función reguladora en la fase G_1. Las lesiones del ADN nuclear dan lugar a la fosforilación, la estabilización y la activación de p53. Al ser activada, esta proteína estimula la transcripción de la proteína p21 que detiene la progresión del ciclo celular para permitir la reparación del daño. Si éste es irreparable, p53 desencadena la apoptosis (figura 2-6).

Meiosis

La meiosis es el proceso durante el cual el número de cromosomas se reduce de modo que se forman células que sólo contienen un miembro de cada par de cromosomas homólogos. Así, la meiosis garantiza la producción de una fase haploide en el ciclo de vida, y la fertilización asegura una

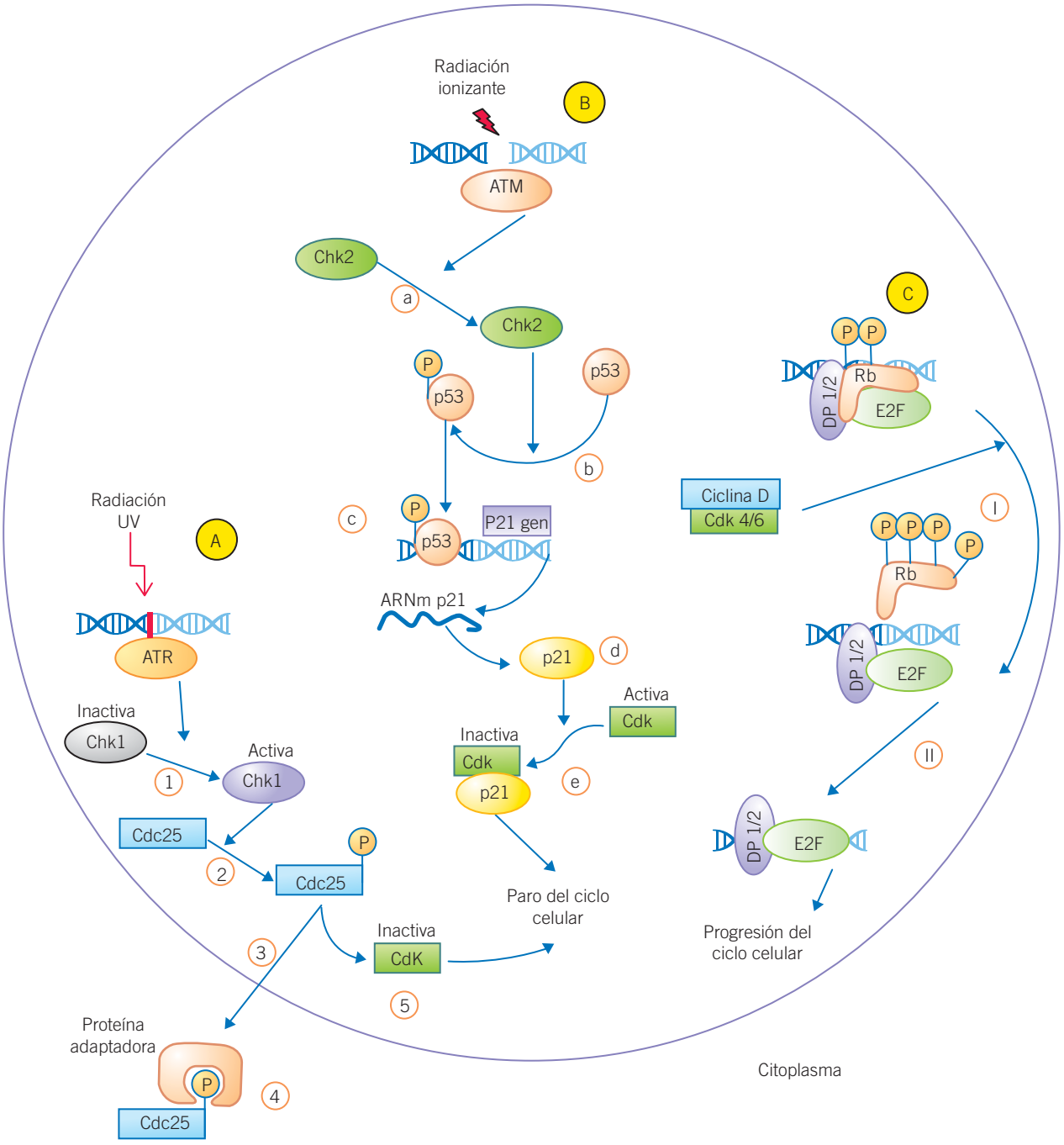


Figura 2-6. Control del ciclo celular. En este esquema se muestran tres de las principales vías que controlan la progresión del ciclo celular. En la vía A se muestra cómo ATR se activa tras un daño específico; éste, a su vez, fosforila y activa la cinasa del punto de revisión Chk1 **1)**, que fosforila y desactiva la fosfatasa Cdc25 **2)**, la cual, en condiciones normales, se desplaza entre el núcleo y el citoplasma **3)**, pero una vez fosforilada se une a una proteína adaptadora en el citoplasma **4)** y no puede importarse de nuevo al núcleo, lo que deja a Cdk en su estado inactivo **5)**. En la vía B se observa cómo ATM, tras activarse por un daño específico, se activa y fosforila y activa la cinasa del punto de revisión Chk2 **a)** que fosforila p53 **b)**, el cual activa la transcripción de P21 **c)**, y la proteína p21 producida inhibe de forma directa la Cdk **e)** en ambas vías, resultando en el paro del ciclo celular. En la vía C se muestra la proteína Rb que, en condiciones normales se encuentra parcialmente fosforilada y unida al factor transcripcional E2F (I); ésta se hiperfosforila por el complejo D-Cdk 4/6, lo que provoca que se desprenda de E2F permitiéndole a la célula entrar a la fase S.

fase diploide. Sin meiosis, la reproducción sexual sería imposible. A diferencia de la mitosis, en la meiosis la duplicación de los cromosomas va seguida por dos divisiones en secuencia que distribuyen los cromosomas entre cuatro núcleos.

Para asegurar que cada núcleo hijo, formado durante la meiosis, posea un miembro de cada par de cromosomas homólogos, ocurre un elaborado proceso de formación de pares de cromosomas que no tienen contraparte en la mitosis. A medida que se alinean los pares de cromosomas se desarrolla un proceso de recombinación genética entre las cromátidas hermanas con intercambio de fragmentos de ADN entre un cromosoma paterno y su correspondiente cromosoma materno, dando como resultado la producción de cromosomas en donde ninguno de ellos es idéntico a otro.

Fases de la meiosis

La meiosis es un tipo especial de división celular que origina gametos o células germinales masculinas y femeninas (espermatozoides y óvulos, respectivamente), cada una de las cuales contiene la mitad de la dotación cromosómica normal. A esta dotación media de cromosomas de cada gameto se la conoce como número haploide (n). Por lo tanto, esta división, también conocida como *gametogénesis*, termina produciendo cuatro células hijas (gametos), que más tarde se fusionarán para formar **cigotos**, que ya tienen el número diploide de cromosomas (2n).

La meiosis se divide en dos fases separadas:

Meiosis I (o división reductora)

En ella tienen lugar algunos sucesos importantes:

- A diferencia de la mitosis, no ocurre separación de cromátidas, sino que cada cromosoma duplicado de cada par homólogo emigra a cada polo del huso.
- Durante esta primera división meiótica hay un intercambio de alelos (genes alternos que representan el código para una misma característica) entre las cromátidas de los pares homólogos de los cromosomas duplicados. Este intercambio supondrá la formación de cromátidas con diferente constitución genética en la célula madre.

Profase I

Ésta es la fase más larga de la meiosis, y en ella los cromosomas homólogos intercambian fragmentos de material genético. Se divide en cinco subfases:

- **Leptoteno:** los cromosomas individuales, compuestos por dos cromátidas unidas por el centrómero, empiezan a condensarse y hacerse visibles, y forman largas tiras en el núcleo.
- **Cigoteno:** los pares de cromosomas homólogos se aproximan entre sí, y tiene lugar la sinapsis o apareamiento, que suele comenzar por los extremos y se extiende a lo largo de los cromosomas. Esta sinapsis, que se establece por medio del complejo sinaptonémico, forma una tétrada.
- **Paquiteno:** se completa la sinapsis en todos los cromosomas. Tiene lugar un entrecruzamiento cromosómico mediante quiasmas, y como consecuencia tiene lugar una recombinación genética. Suelen darse dos o tres de estos entrecruzamientos por cada par bivalente.
- **Diploteno**: comienza la separación de los cromosomas homólogos, y pone aún más de manifiesto los quiasmas.
- **Diacinesis**: los cromosomas se condensan al máximo y desaparecen el núcleo y la membrana nuclear, por lo que quedan libres en el citoplasma. Se puede apreciar cómo cada bivalente está unido por cuatro cromátidas (tétradas).

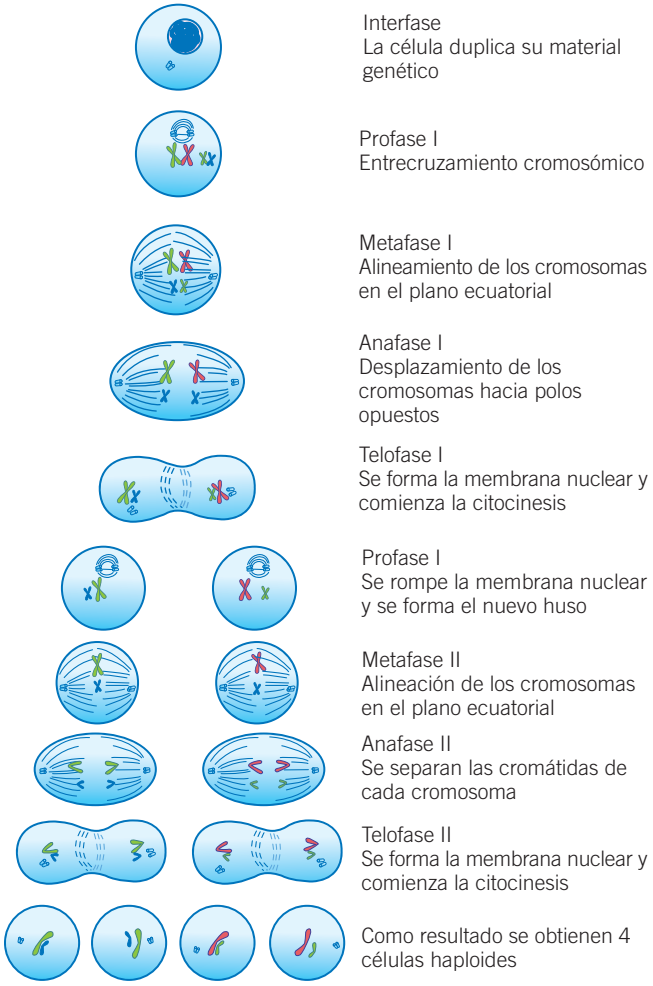


Figura 2-7. Etapas de la meiosis. Esquema general de las fases involucradas en la meiosis.

Metafase I

Durante esta fase los cromosomas homólogos se alinean en el plano ecuatorial completamente al azar, lo que garantiza la reunión de los cromosomas maternos y paternos.

Anafase I

Es la separación de cada bivalente, que se desplazan hacia los polos opuestos de la célula. Cada cromosoma sigue constituido aún por dos cromátidas.

Telofase I

Esta fase es parecida a la de la mitosis: los cromosomas llegan hasta los polos opuestos, se vuelven a formar los núcleos y comienza la citocinesis. Cada célula hija recibe 23 cromosomas (n), pero como cada cromosoma está compuesto por dos cromátidas, el contenido de ADN todavía es diploide. Cada una de las células hijas recién formadas entra en la meiosis II.

Meiosis II (o división ecuatorial)

Tan sólo tiene lugar la separación por el centrómero de cada cromosoma para liberar las cromátidas que emigran a cada polo opuesto del huso.

En el hombre, cada uno de los cuatro gametos resultantes sufre una transformación hasta espermatozoide maduro. En la mujer, el citoplasma se distribuye de manera desigual entre los cuatro gametos resultantes: uno de ellos lo gana casi todo (óvulo), mientras que los otros tres (cuerpos residuales) degeneran.

Esta división no va precedida por una fase S; por lo demás, resulta bastante similar a la mitosis:

Profase II

Es muy corta; se rompe la membrana nuclear y se forma el nuevo huso.

Metafase II

Los cromosomas, cada uno de ellos formado por dos cromátidas, se alinean en el plano ecuatorial.

Anafase II

Se separan las cromátidas de cada cromosoma.

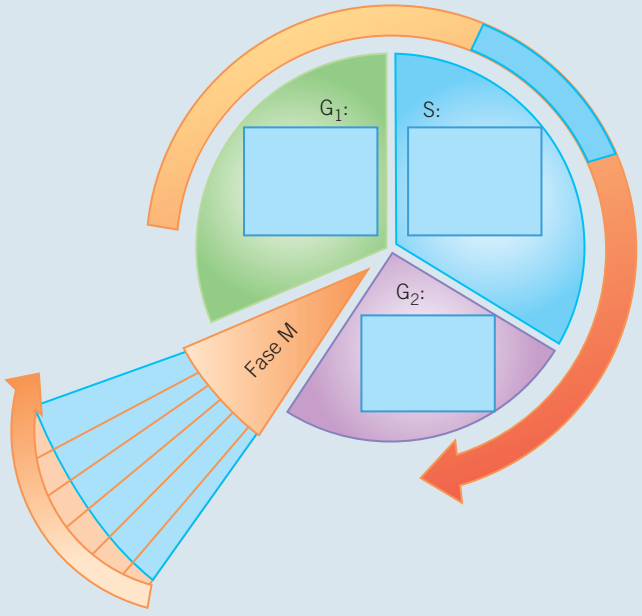
Telofase II

Se forma la membrana nuclear alrededor de los cuatro núcleos haploides y comienza la citocinesis.

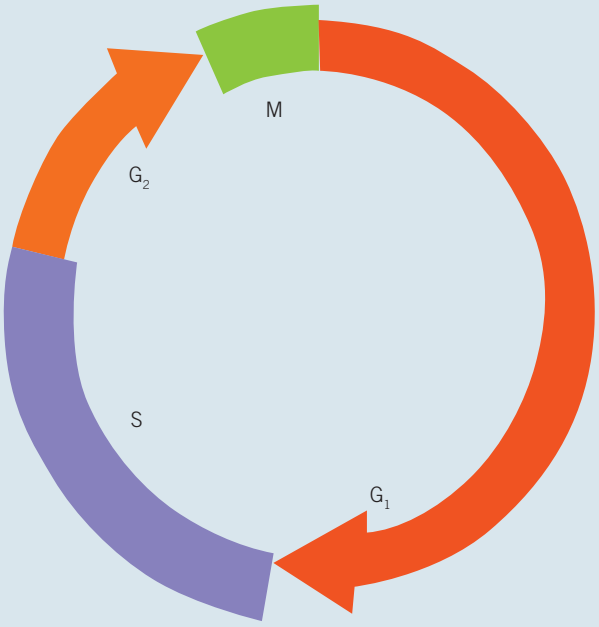
El resultado final son cuatro células hijas que, a diferencia de lo que ocurre en la mitosis, contienen el número haploide de cromosomas y son distintas desde el punto de vista de su dotación genética. Esto significa que cada gameto contiene su propio complemento genético único (figura 2-7).

Ejercicios de integración

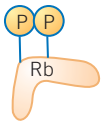
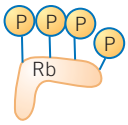
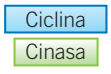
1. Complete la imagen colocando el nombre de las etapas que componen la fase M y su duración promedio. Asimismo, describa las características principales de las fases G_1, S y G_2 y el nombre con el que se conoce a estas tres etapas en conjunto.



2. Señale la ubicación de los puntos de control dentro del ciclo celular y qué características revisan cada uno de ellos.



3. Escriba en los cuadros inferiores si el estado de la proteína de arriba es activo o inactivo.

Preguntas de repaso

1. En cuanto a las células hijas originadas, ¿cuál es la diferencia principal entre mitosis y meiosis?
2. Mencione las fases que componen la mitosis en orden de ejecución.
3. Cuando se habla de células con un número haploide y diploide de cromosomas, ¿a qué se hace referencia?
4. Mencione la ubicación de los tres principales puntos de control dentro del ciclo celular y qué es lo que se verifica en cada uno de ellos.
5. Para permitir la progresión del ciclo celular, ¿es necesario que las Cdk se encuentren en su forma activa o inactiva? ¿Qué proteínas activan e inactivan a las Cdk?

Bibliografía

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, *et al.* *Introducción a la biología celular*, 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2006:611-671.

Gregory CS, Stephen CW. *Patología estructural. Fundamentos clínicos patológicos en medicina*, 4ª ed. Barcelona: McGraw-Hill Interamericana, 2000.

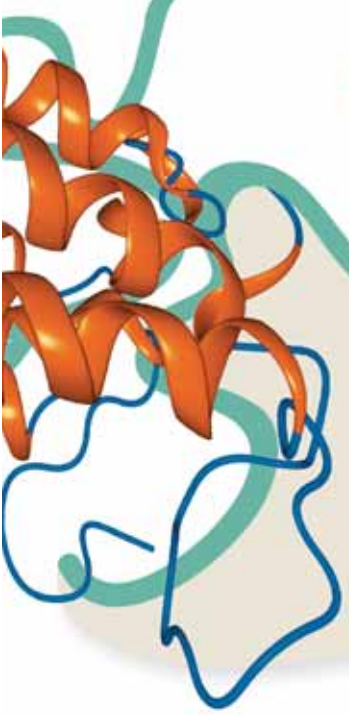
Karp G. *Biología celular y molecular*. México, DF: McGraw-Hill Interamericana, 2006:621-669.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology*, 4ª ed. Nueva York: Freeman, 2000.

Luque J, Herráez A. *Biología molecular e ingeniería genética*. Madrid: Harcourt Editora, 2006:97-106.

Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VK. *Bioquímica de Harper*, 15ª ed. México, DF: El Manual Moderno, 2001.

Rubín E, Gorstein F, Rubín R, Schwarting R, Strayer D. *Patología estructural. Fundamentos clinicopatológicos en Medicina*, 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana Aravaca, 2006:99-101.



Capítulo 3

Ácidos nucleicos

José Navarro Partida / Mayra Mena Enríquez

Introducción

Las células son las unidades funcionales de cualquier organismo vivo. Las instrucciones necesarias para dirigir sus actividades están contenidas en los cromosomas, que en el caso de las eucariotas se localizan en el núcleo celular y son conocidas en su conjunto como información genética.

Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos constituyen el material genético de los organismos y son necesarios para el almacenamiento y la expresión de la información genética. Existen dos tipos de ácidos nucleicos química y estructuralmente distintos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN); ambos se encuentran en todas las células procariotas, eucariotas y virus. El ADN funciona como el almacén de la información genética y se localiza en los cromosomas del núcleo, las mitocondrias y los cloroplastos de las células eucariotas. En las células procariotas el ADN se encuentra en su único cromosoma y, de manera extracromosómica, en forma de plásmidos. El ARN interviene en la transferencia de la información contenida en el ADN hacia los compartimientos celulares. Se encuentra en el núcleo, el citoplasma, la matriz mitocondrial y el estroma de cloroplastos de células eucariotas y en el citosol de células procariotas.

Composición de los ácidos nucleicos

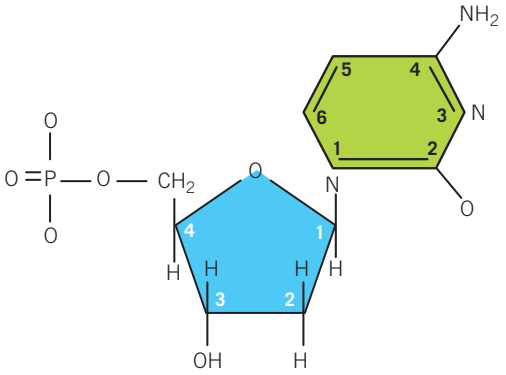
La unidad básica de los ácidos nucleicos es el nucleótido, una molécula orgánica compuesta por tres componentes:

1. **Base nitrogenada**, una purina o pirimidina.
2. **Pentosa**, una ribosa o desoxirribosa según el ácido nucleico.
3. **Grupo fosfato**, causante de las cargas negativas de los ácidos nucleicos y que le brinda características ácidas (figura 3-1).

Las **bases nitrogenadas** son moléculas formadas de átomos de carbono y nitrógeno que crean anillos heterocíclicos. Se conocen dos tipos de bases nitrogenadas: las purinas y las pirimidinas. Las purinas se componen de dos anillos condensados, mientras que las pirimidinas están formadas por un solo anillo. Los átomos de carbono y nitrógeno de los anillos se identifican mediante números naturales: del 1 al 6 para las pirimidinas y del 1 al 9 para las purinas (figura 3-2). Las purinas se sintetizan *de novo* en el hígado como mononucleótidos unidos con una molécula de ribosa 5-fosfato; las pirimidinas lo hacen como bases libres y después se unen a la ribosa 5-fosfato. Es importante mencionar que el recambio de ácidos nucleicos da lugar a la liberación de bases libres, tanto de purinas como pirimidinas; estas bases se reciclan y se unen a una pentosa y un grupo fosfato para generar de nuevo el nucleótido.

Las purinas características de los ácidos nucleicos son adenina (A) y guanina (G), ambas presentes en los nucleótidos del ADN y del ARN. Las pirimidinas características de los ácidos nucleicos son la citosina (C), la timina (T) y el uracilo (U). La C está presente en los nucleótidos que componen tanto al ADN como al ARN, mientras que la T sólo forma los nucleótidos que componen al ADN y el U, únicamente los nucleótidos que componen al ARN.

La **pentosa** que compone el nucleótido es la D-ribosa para el ARN y la D-desoxirribosa en el caso del ADN. Los nucleótidos que contienen ribosa se denominan *ribonucleótidos*, mientras que los que contienen desoxirribosa, *desoxirribonucleótidos*. Los carbonos de la pentosa se identifican en los nucleótidos mediante números del 1 al 5, con una comilla, y se denominan *primos*. La diferencia entre la ribosa y la desoxirribosa es que la primera posee un grupo OH en el carbono dos, mientras que la segunda carece de



Grupo fosfato + Pentosa + Base nitrogenada

Figura 3-1. Estructura de los nucleótidos.

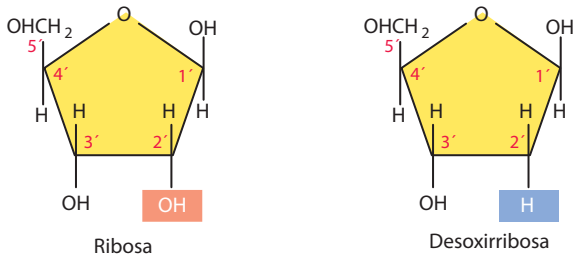
dicho grupo funcional y sólo cuenta con un hidrógeno (figura 3-3).

Nucleósidos

La unión de una base nitrogenada y la pentosa produce un nucleósido, mediante un enlace covalente denominado *N-glucosídico* que se forma entre el C-1' de la pentosa y el N-1 de las pirimidinas o bien el N-9 de las purinas (figura 3-4). Si la base nitrogenada se une a una ribosa da lugar a los ribonucleósidos, y si, por el contrario, lo hace a una desoxirribosa genera los desoxirribonucleósidos.

Nucleótidos

La unión de un grupo fosfato a un nucleósido da lugar a una molécula de nucleósido monofosfato o nucleótido, como por ejemplo la adenosina monofosfato (AMP). Si se agrega un segundo o un tercer fosfato al nucleósido monofosfato se obtiene un nucleósido difosfato (como el ADP) o bien trifosfato (como el ATP). Los nucleósidos, en su forma de monofosfato, son los componentes de los ácidos nucleicos; aunque cuando se encuentran libres lo están en su forma trifosfatada. El primer fosfato se une al nucleósido mediante un enlace éster con el OH del carbono 5' de la pentosa. El



Ribosa Desoxirribosa

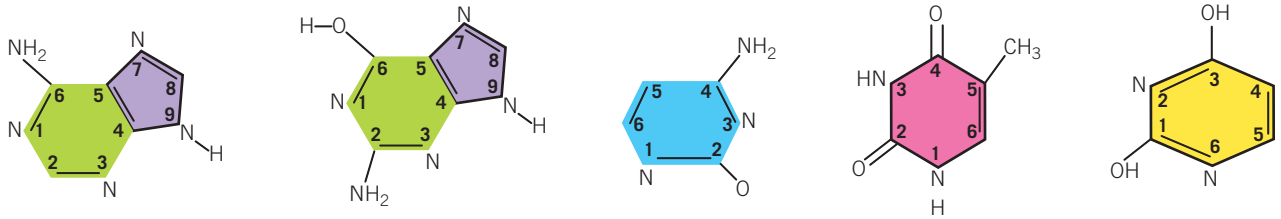
Figura 3-3. Estructura hemiacetal de la ribosa y desoxirribosa.

segundo y el tercer fosfatos se conectan con el nucleótido mediante un enlace fosfoanhídrido que requiere un gasto de energía para su formación. Químicamente, los nucleótidos pueden definirse como ésteres monofosfato, difosfato o trifosfato de nucleósidos. Los nucleótidos son moléculas ácidas, ya que el grupo fosfato se ioniza en medio acuoso. (Para la nomenclatura completa de las moléculas nucleotídicas véase el cuadro 3-1.)

Cadenas de ácidos nucleicos o polinucleótidos

Los nucleótidos se unen mediante enlaces fosfodiéster para dar lugar a cadenas de ácidos nucleicos o polinucleótidos. El enlace fosfodiéster tiene lugar entre el C-5'-fosfato de un nucleótido y el C-3'-hidroxilo del siguiente nucleótido. La unión sucesiva de nucleótidos mediante enlace 3,5-fosfodiéster genera un polinucleótido polarizado; es decir, con extremos diferentes. Por un lado de la cadena se encuentra un extremo 5'-fosfato y, por el otro, un extremo 3'-hidroxilo (figura 3-5). Si la cadena es de ribonucleótidos, se genera un polirribonucleótido o cadena de ARN, mientras que si la cadena se forma con desoxirribonucleótidos se origina un polidesoxirribonucleótido o cadena de ADN.

Los nucleótidos que constituyen las cadenas de ADN contienen las bases A, G, T y C; mientras que los nucleótidos que forman las cadenas de ARN están constituidos por las bases nitrogenadas A, G, C y U. Por consenso universal, la secuencia de nucleótidos en una cadena de polinucleótidos se escribe en dirección 5' → 3', y el orden exacto de nucleótidos o secuencia de la cadena se considera la estruc-



Adenina Guanina Citosina Timina Uracilo

Figura 3-2. Bases nitrogenadas.

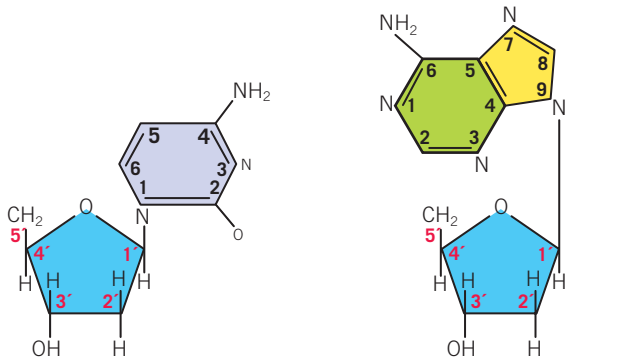


Figura 3-4. Estructura de los nucleósidos.

tura primaria de los ácidos nucleicos. El enlace fosfodiéster entre nucleótidos puede escindirse por las nucleasas: DNasas para el ADN y RNasas para el ARN.

Estructura del ADN

Estructura primaria del ADN

Corresponde a la secuencia de nucleótidos del polinucleótido linearizado (figura 3-6). La información genética está contenida en el orden exacto de las bases nitrogenadas que componen los nucleótidos, y si se modifica alguna de estas bases o su orden se alterará la información.

Estructura secundaria del ADN

En células eucariotas el ADN se encuentra como una cadena doble de polidesoxirribonucleótidos (*double strand DNA*, dsADN). Las dos cadenas del ADN giran alrededor de un eje de simetría imaginario y forman una estructura helicoidal, de aquí su nombre de "doble hélice del ADN" descrita por Watson y Crick en 1953. En la hélice del ADN, la columna hidrofílica de desoxirribosa-fosfato de cada cadena está en el exterior de la molécula, mientras que las bases nitrogenadas hidrófobas se orientan hacia el interior. La relación espacial que se genera por el giro entre las dos cadenas de la hélice crea un surco mayor (ancho) y uno menor (estrecho) (figura 3-7). La doble cadena del ADN tiene tres características principales:

- Es antiparalela.
- Es complementaria.
- Forma un giro helicoidal dextrógiro o levógiro.

La asociación entre las dos cadenas es ***antiparalela***; es decir, el extremo 5´ de una se asocia con el extremo 3' de la otra. Las dos cadenas son ***complementarias***; esto es, las bases nitrogenadas de una de las cadenas del ADN se unen mediante puentes de hidrógeno a las bases nitrogenadas de

Cuadro 3-1. Nomenclatura de nucleótidos.

Base	Nucleósido Base + ribosa	Nucleótido Base + ribosa 1 grupo fosfato	2 grupos fosfato	3 grupos fosfato
Adenina	Adenosina	Ácido adenílico Adenosina monofosfato (AMP)	Adenosina difosfato (ADP)	Adenosina trifosfato (ATP)
Guanina	Guanosina	Ácido guanílico Guanosina monofosfato (GMP)	Guanosina difosfato (GDP)	Guanosina trifosfato (GTP)
Citosina	Citidina	Ácido citidílico Citidina monofosfato (CMP)	Citidina bifosfato (CDP)	Citidina trifosfato (CTP)
Uracilo	Uridina	Ácido uridílico Uridina monofosfato (UMP)	Uridina difosfato (CDP)	Uridina trifosfato (UTP)
Base	**Desoxinucleósido Base + desoxirribosa**	**Nucleótido Base + desoxirribosa 1 grupo fosfato**	**2 grupos fosfato**	**3 grupos fosfato**
Adenina	Desoxiadenosina	Ácido desoxiadenílico Desoxiadenosina monofosfato (AMP)	Desoxiadenosina difosfato (ADP)	Desoxiadenosina trifosfato (ATP)
Guanina	Desoxiguanosina	Ácido desoxiguanílico Desoxiguanosina monofosfato (GMP)	Desoxiguanosina difosfato (GDP)	Desoxiguanosina trifosfato (GTP)
Citosina	Desoxicitidina	Ácido desoxicitidílico Desoxicitidina monofosfato (CMP)	Desoxicitidina difosfato (CDP)	Desoxicitidina trifosfato (CTP)
Uracilo	Desoxiuridina	Ácido desoxiuridílico Desoxiuridina monofosfato (UMP)	Desoxiuridina difosfato (UDP)	Desoxiuridina trifosfato (UTP)

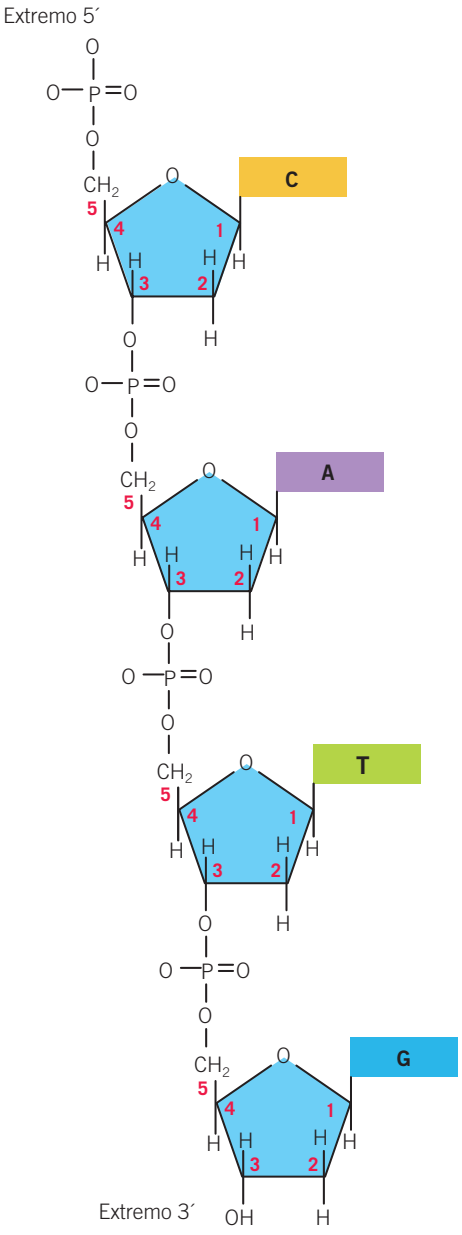


Figura 3-5. Formación de un polinucleótido o cadena de ADN.

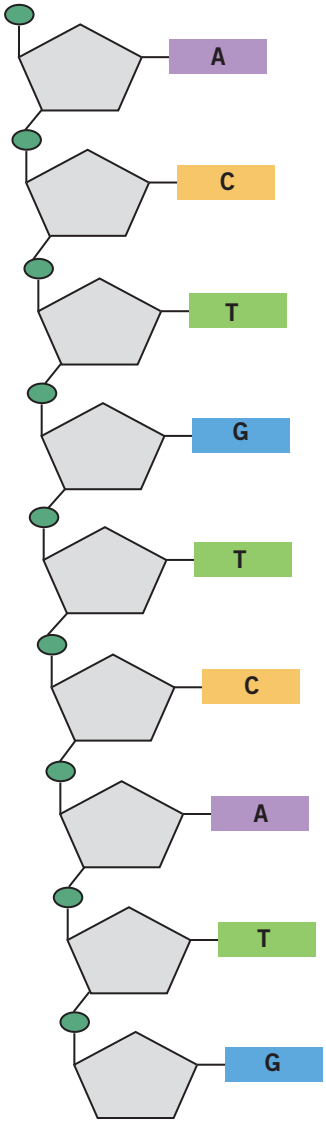


Figura 3-6. Estructura primaria del ADN.

la otra cadena, de manera que A siempre se une a T, y G a C. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos de una cadena define y complementa la secuencia de nucleótidos en la otra. Así, una cadena de la doble hélice del ADN siempre es el complemento de la otra. Los pares de bases se mantienen unidos mediante dos enlaces de hidrógeno entre A y T, y tres enlaces de hidrógeno entre G y C (figura 3-8). El apareamiento específico de bases entre las cadenas de ADN sustenta las llamadas *reglas de Chargaff*: en cualquier muestra de ADN de cadena doble, la cantidad de A es igual a la cantidad de T, la cantidad de G es igual a la de C, y la cantidad de purinas es igual a la de pirimidinas.

Variantes de la doble cadena de ADN

Se han descrito tres formas estructurales principales del ADN: la forma B, descrita por Watson y Crick, la forma A y la forma Z. La forma B es la que adopta el ADN en condiciones fisiológicas, por lo que es la estructura predominante en el ADN cromosómico. La forma A se produce *in vitro* con la deshidratación moderada de la forma B. Es probable que la conformación de los híbridos ADN-ARN y del ARN de doble cadena se asemeje a la forma A. La forma Z del ADN es característica de regiones donde se encuentra una secuencia de purinas y pirimidinas alternadas (por ejemplo, zonas de repetición de GC). La función biológica del ADN-Z es poco comprendida, pero puede estar relacionada con la regulación de la expresión génica. Las características detalladas de cada una de las variantes se describen en el cuadro 3-2.

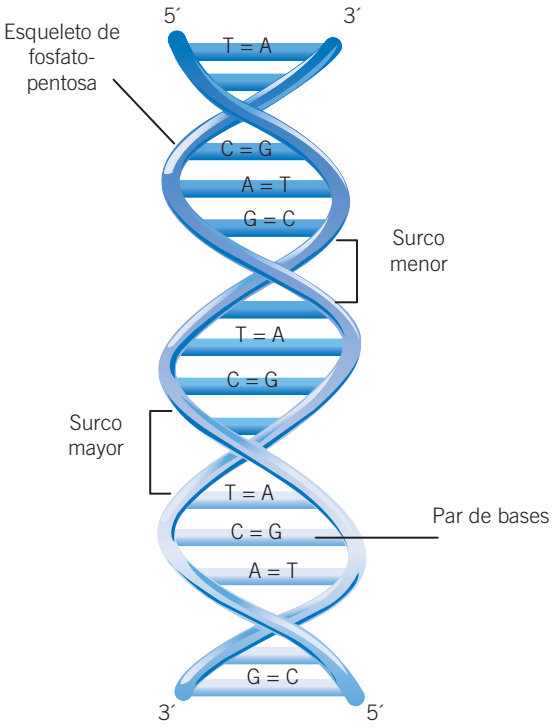


Figura 3-7. Doble hélice del ADN.

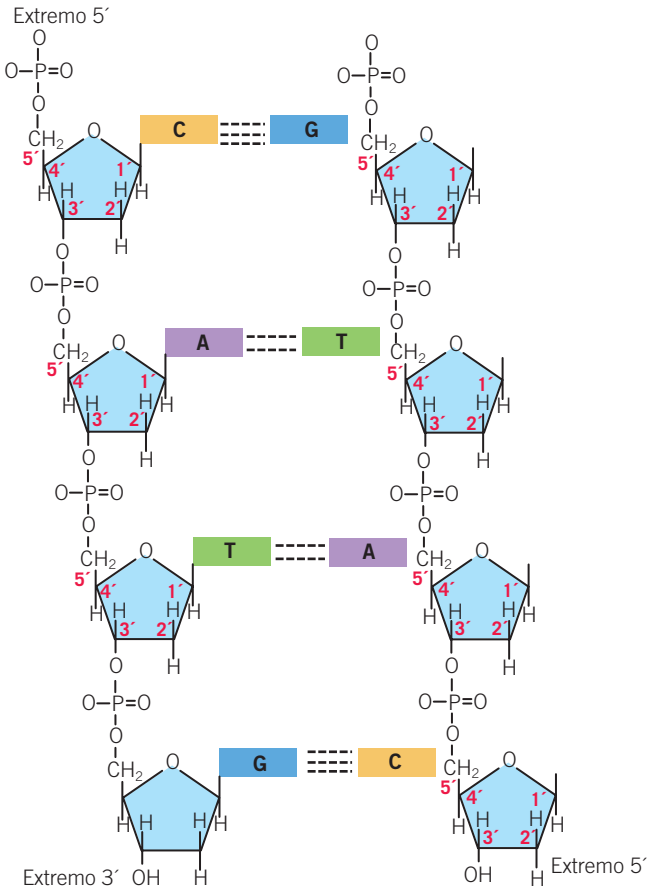


Figura 3-8. Estructura del ADN.

ADN circular

El ADN mitocondrial y el de células procariotas se encuentra en forma de molécula circular, sin extremos, donde no hay interrupción de los enlaces fosfodiéster. Es posible encontrar al ADN circular como una estructura relajada (figura 3-9A) o como una estructura superenrollada y más compacta, donde la hélice del ADN (ya enrollada) gira sobre sí misma (superenrollada) y genera una superhélice (figura 3-9B). El superenrollamiento se produce debido a la acción de las enzimas topoisomerasas, que mediante el corte transitorio de una o ambas hebras introducen un aumento o una disminución (superenrollamiento positivo o negativo, respectivamente) en el número de vueltas de hélice. El ADN circular superenrollado permite la compactación del

Cuadro 3-2. Características de los tipos de ADN según su estructura.

Características	Tipo estructural del ADN		
	ADN A (deshidratada)	ADN B (Watson-Crick)	ADN Z (Rich-Dickerson)
Sentido de giro de la hélice	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Diámetro de la hélice	2.55 nm (25.5 A)	2.37 nm (23.7 A)	1.84 nm (1.84 A)
Distancia entre pares de bases	0.23 nm (2.3 A)	0.34 nm (3.4 A)	0.38 nm (3.8 A)
Pares de bases por vuelta	11	10.4	12
Inclinación del plano de los pares de bases	19° (gran inclinación)	1.2° (casi perpendicular al eje de la hélice)	9° (ligera inclinación)
Surco mayor	Estrecho, profundo	Ancho, profundidad media	Plano, sin profundidad
Surco menor	Amplio, no profundo	Estrecho, profundidad media	Estrecho, profundo

Tipos de estructura secundaria de ADN. La molécula de ADN toma una estructura diferente según el microambiente en el que se encuentre, con ello el número de bases por giro, la inclinación y el giro de la molécula varía; estas características influyen en su disponibilidad como fuente de información genética

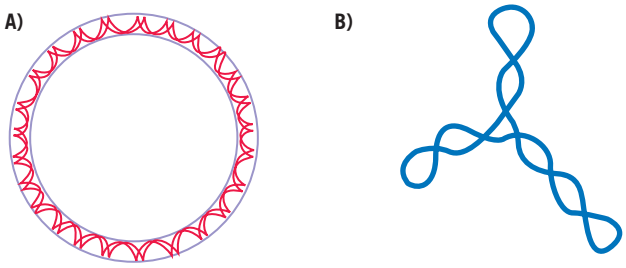


Figura 3-9. Moléculas de ADN circular.

ADN para que ocupe menor espacio en la células; también permite que posiciones lejanas en la secuencia se aproximen, y además regula la accesibilidad a la información genética y la expresión génica, al mantenerse inaccesible para los factores de transcripción.

Niveles de empaquetamiento del ADN

Debido a la longitud del ADN genómico en las células eucariotas (alrededor de 2 metros/célula) es necesaria su compactación, de manera que permita ocupar menos espacio y quepa dentro del núcleo de la célula. El ADN se asocia con nucleoproteínas (histonas y no-histonas) para formar la cromatina y dar origen a los cromosomas; por ello, en el empaquetamiento del ADN se distinguen diferentes niveles de organización, que se describen a continuación.

Nucleosoma

Las histonas son proteínas con carga positiva a pH fisiológico, debido a su alto contenido en aminoácidos básicos, como la lisina y la arginina. Esta propiedad les permite asociarse a la molécula de ADN de carga negativa (conferida por los grupos fosfato). Existen cinco tipos de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4. Dos moléculas de histona H2A, H2B, H3 y H4 se asocian para formar un octámero de histonas. Un segmento de ADN de doble cadena de aproximadamente 146 pb se enrolla dando 1.6 vueltas al octámero para formar una estructura llamada *nucleosoma*. Los diferentes fragmentos de ADN presentes en el núcleo se asocian a diversos octámeros y forman una cadena de nucleosomas conocida como "cuentas de rosario" o "cuentas de collar" por su semejanza con estas estructuras al observarse en el microscopio electrónico. Entre cada nucleosoma queda un segmento de ADN de aproximadamente 55 pb denominado ADN enlace o *linker* (figura 3-10A). La función del nucleosoma es condensar el ADN en una fibra de 11 nm de ancho que se asemeja al mencionado *collar de perlas*, donde cada nucleosoma sería una perla y el ADN de enlace, el cordón con el cual están unidas estas perlas. El ADN *linker* se asocia, entonces, con otra histona denominada H1 y ayuda al empaquetamiento del ADN, lo que facilita la formación de otra estructura, llamada *solenoide*, que se describirá con detalle en la siguiente sección. El extremo aminoterminal de las histonas puede unirse de manera reversible a grupos acetilo, metilo o fosfato, lo que se conoce como *modificaciones epigenéticas*; la adición de estos grupos modifica la unión de las histonas al ADN y, por tanto, regula la disponibilidad de la información génica.

Solenoide

Los nucleosomas se compactan para formar un polinucleosoma de seis unidades mediante interacciones entre las H1 de cada nucleosoma, lo que genera una estructura más compacta. Esta estructura recibe el nombre de *solenoide* y forma una hebra de 30 nm, conocida como *cromatina*, en este nivel el ADN está compactado unas 100 veces. La cromatina puede encontrarse activa de forma transcripcional, por lo que se descompacta y entonces recibe el nombre de *eucromatina*. La cromatina inactiva se encuentra en su forma compacta y se la conoce como *heterocromatina*.

Asas cromatínicas

La fibra de 30 nm se pliega y condensa aún más, formando estructuras de asas amplias superenrolladas, las cuales se anclan sobre proteínas de andamiaje y dan lugar una hebra de 300 nm de grosor.

Cromosoma condensado

Las asas cromatínicas se compactan y forman un cromosoma condensado de 700 nm de espesor visible durante la interfase.

Cromosomas mitóticos

Las cromátides hermanas visibles en la mitosis representan la última etapa de la organización del ADN y llegan a medir 1 400 nm de grosor.

Los niveles de empaquetamiento del ADN se presentan esquematizados en la figura 3-10B.

Desnaturalización y renaturalización del ADN

La desnaturalización es la pérdida de la estructura helicoidal (estructura secundaria) característica de la molécula de ADN. El proceso de desnaturalización ocurre por la rotura de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, lo que ocasiona la separación de las dos cadenas antiparalelas sin que se altere la estructura primaria, ya que los enlaces fosfodiéster no resultan afectados.

La desnaturalización puede ocurrir por exposición de los ácidos nucleicos a agentes químicos o físicos, cambios de pH y enzimas.

Los agentes desnaturalizantes, como la urea, la formamida y el formaldehído, son altamente polares, con grupos amino y carbonilo que compiten con los grupos amino y carbonilo de las bases nitrogenadas en la formación de

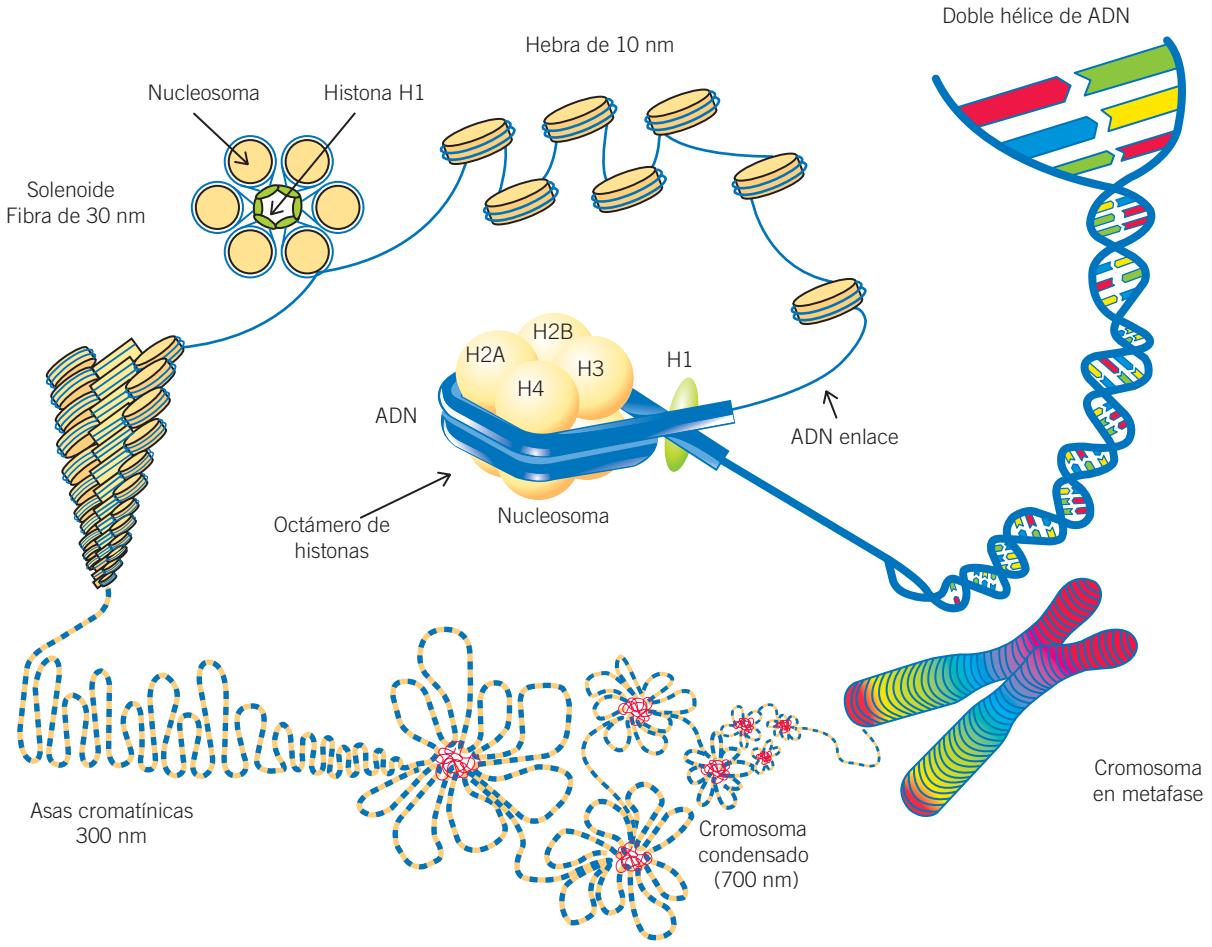


Figura 3-10. Niveles de empaquetamiento del ADN.

puentes de hidrógeno y dan lugar a la separación de las hebras. También un pH extremadamente alcalino o ácido puede desnaturalizar el ADN; sin embargo, este tratamiento puede dar lugar a la rotura de enlaces fosfodiéster, y por lo tanto, a la pérdida de la estructura primaria. La temperatura es el agente desnaturalizante más representativo: el calentamiento gradual del ADN hasta llegar a 100°C debilita las fuerzas estabilizadoras de la doble hélice, de forma que las dos hebras se desenrollan hasta su separación total. La temperatura de fusión (T_m) se define como la temperatura a la que se ha desnaturalizado el 50% de las moléculas de ADN de la muestra que se está calentando. La T_m representa el punto en que la energía aplicada es suficiente para romper la mitad de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos cadenas de la molécula de ADN. Una muestra de ADN con alto contenido de G y C tiene una mayor T_m en comparación con una con alto contenido de A y T. Esto se debe a que G y C están unidas con tres puentes de hidrógeno, a diferencia de A y T, que lo están por dos puentes de hidrógeno, por lo que para disociarlas se requiere una temperatura mayor. La pérdida de la estructura helicoidal del ADN puede vigilarse con la medición de su absorbancia a 260 nm, ya que el ADN de cadena sencilla tiene una absorbancia relativa mayor que el ADN de cadena doble en la misma longitud de onda.

Las topoisomerasas, las girasas y las helicasas son enzimas que pueden desenrollar (desnaturalizar) el ADN. Las topoisomerasas cortan una o ambas hebras del ADN, lo que provoca la relajación del superenrollamiento. Las girasas actúan desenrollando el ADN circular presente en las bacterias, y las helicasas se unen al ADN cerca de la horquilla de replicación, rompen los puentes de hidrógeno y catalizan la separación de las hebras mediante la energía liberada por hidrólisis de ATP.

El ADN desnaturalizado puede renaturalizarse si se retira gradualmente el agente desnaturalizante. Por ejemplo, si una solución de ADN desnaturalizada por calentamiento se enfría lentamente, las dos cadenas se vuelven a asociar por complementariedad de sus bases.

ARN

Es el ácido nucleico más abundante en la célula eucariota, donde suele ser 10 veces más abundante que el ADN.

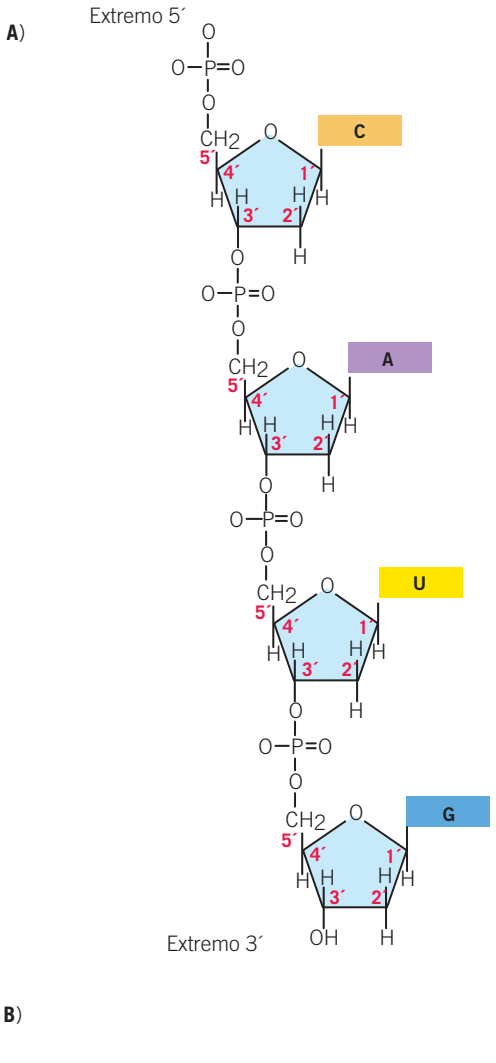


Figura 3-11. Estructura primaria y secundaria del ARN.

En cuanto a su estructura tres características diferencian al ARN del ADN:

1. El ARN suele ser monocatenario (una sola cadena).
2. Contiene uracilo en lugar de timina.
3. La pentosa que constituye a sus nucleótidos es la ribosa, en lugar de la 2-desoxirribosa del ADN (la presencia del grupo hidroxilo en el C2´ de la ribosa provoca que el ARN sea una molécula químicamente inestable).

Estructura primaria del ARN

Al igual que en el ADN la estructura primaria del ARN está determinada por secuencia lineal de sus ribonucleótidos, que se escriben siempre en dirección 5'-3' (figura 3-11A).

Estructura secundaria del ARN

La estructura secundaria está dada por el apareamiento de secuencias complementarias en la misma cadena de ARN (asociación intracatenaria parcial) o por asociaciones intercatenarias, en el caso de los ARN de doble cadena de ciertos virus. La complementariedad ocasional de bases en el ARN da origen a las ***estructuras de pasador (hairpin)***, formaciones típicas, en las cuales parte de la cadena de ARN es complementaria y origina puentes de hidrógeno entre ésta y la parte no complementaria da origen a un *loop* o asa de bases que no se unen como se aprecia en la figura 3-11B.

Estructura terciaria del ARN

La estructura terciaria del ARN no siempre se forma, sólo surge cuando las condiciones celulares propician la interacción entre bases nitrogenadas de diferentes regiones de una misma molécula de ARN. Los ARN de transferencia (ARNt) forman una estructura terciaria característica: en disolución están plegados en forma de "L" compacta estabilizada por apareamientos de bases convencionales y por interacciones entre las bases de más de dos nucleótidos, como los tripletes de bases (véase el capítulo 6). Las bases nitrogenadas pueden interactuar a través de los átomos de hidrógeno para unirse al esqueleto fosfodiéster de la cadena de ARN, o bien a través del OH del carbono 2' de la ribosa, que actúa como un importante dador y aceptor de hidrógenos.

Tipos de ARN

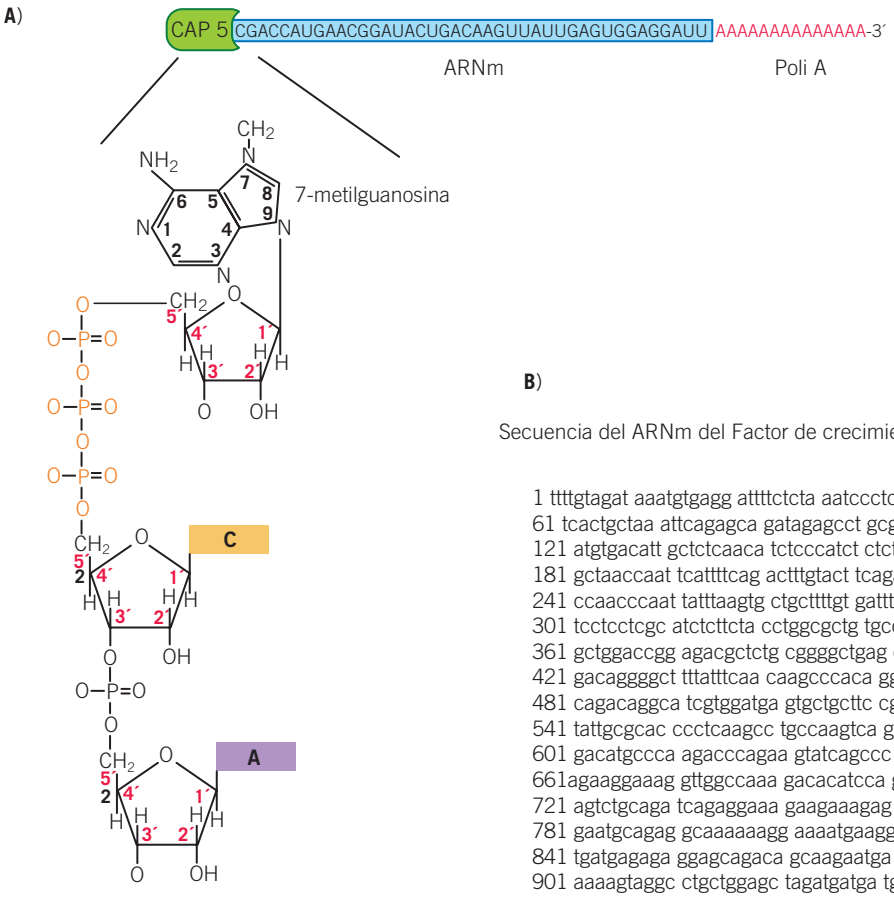
Aunque químicamente son iguales, los ARN según la función que desempeñen en la célula se agrupan en:

ARN heterogéneo nuclear

Es un ARN también conocido como tránscrito primario, de alto peso molecular. Es el producto inicial de la síntesis de la ARN polimerasa en el proceso de transcripción. En el núcleo de las células eucariotas actúa como precursor de los demás tipos de ARN que se encuentran en el citoplasma. La fragmentación del ARNhn para formar otros tipos de ARN supone la maduración o el procesamiento del ARN (véase el capítulo 5). En las células procariotas, el tránscrito primario actúa directamente como molde para la síntesis de proteínas, sin necesidad de maduración o modificaciones postranscripcionales.

ARN mensajero (ARNm)

El ARNm sirve de molde para la síntesis de proteínas en el proceso de traducción, ya que contiene la información génica para la formación de uno o varios polipéptidos (véase el capítulo 6). El ARNm se localiza en el citoplasma, su longitud es variable según la proteína para la que codifique y contiene, además, las señales necesarias para el inicio y la terminación de la traducción. En eucariotes el ARNm presenta características especiales: en su extremo 5' muestra



B)

Secuencia del ARNm del Factor de crecimiento tipo insulina de humano (IGF1)

1 ttttgtagat aaatgtgagg attttctcta aatccctctt ctgtttgcta aatctcactg
61 tcactgctaa attcagagca gatagagcct gcgcaatgga ataaagtcct caaaattgaa
121 atgtgacatt gctctcaaca tctcccatct ctctggattt ctttttgctt cattattcct
181 gctaaccaat tcattttcag actttgtact tcagaagcaa tgggaaaaat cagcagtctt
241 ccaacccaat tatttaagtg ctgcttttgt gatttcttga aggtgaagat gcacaccatg
301 tcctcctcgc atctcttcta cctggcgctg tgcctgctca ccttcaccag ctctgccacg
361 gctggaccgg agacgctctg cggggctgag ctggtggatg ctcttcagtt cgtgtgtgga
421 gacaggggct tttatttcaa caagcccaca gggtatggct ccagcagtcg gagggcgcct
481 cagacaggca tcgtggatga gtgctgcttc cggagctgtg atctaaggag gctggagatg
541 tattgcgcac ccctcaagcc tgccaagtca gctcgctctctg tccgtgccca gcgccacacc
601 gacatgccca agacccagaa gtatcagccc ccatctacca acaagaacac gaagtctcag
661agaaggaaag gttggccaaa gacacatcca ggaggggaac agaaggaggg gacagaagca
721 agtctgcaga tcagaggaaa gaagaaagag cagaggaggg agattggaag tagaaatgct
781 gaatgcagag gcaaaaaagg aaaatgaagg acaggaggat taaacagaca gaggcaagga
841 tgatgagaga ggagcagaca gcaagaatga aaagcagaaa atacaataga ggaaatgaag
901 aaaagtaggc ctgctggagc tagatgatga tgtgatggaa atagaagta

Figura 3-12. Secuencia de un ARN mensajero.

una capucha (cap) y en su extremo 3', una cadena de poliadeninas (cola poliA) de longitud variable (figura 3-12). Estas modificaciones tienen por objeto aumentar la vida media de esta molécula en el citoplasma y permitir su disponibilidad en el proceso de traducción proteica. La presencia de la cola de poliA en el extremo 3´ facilita su purificación cuando se emplea cromatografía en columna de afinidad, ya que forma híbridos con residuos de poliuridinas (poli U) unidos a una resina empaquetada en el interior de la columna.

ARN ribosomal (ARNr)

El ARNr forma parte de los ribosomas, estructuras intracelulares en que se realiza la síntesis de proteínas (figura 3-13). Sus estructuras secundaria y terciaria presentan un plegamiento complejo que le permite asociarse tanto a las proteínas de los ribosomas como a otros ARNr y participar en el proceso de síntesis proteica.

ARN de transferencia (ARNt)

Las moléculas de ARNt tienen entre 75 y 90 nucleótidos, y su peso molecular es de unos 2.5 kDa. Se conocen unos 32 ARNt distintos y se encuentran en todas las células. Éstos intervienen en la síntesis de proteínas, ya que van unidos a un aminoácido que liberarán en el ribosoma durante el proceso de traducción. Suelen presentar bases nitrogenadas inusuales, como la inosina, la dihidrouridina, etc., e incluso la timina. Su estructura secundaria presenta un plegamiento complejo donde se encuentran zonas con apareamiento de secuencias complementarias y otras sin apareamiento de secuencias complementarias, y en donde se pueden distinguir regiones críticas, como la de unión al aminoácido y el

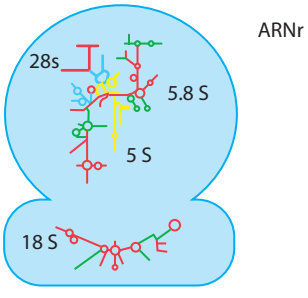


Figura 3-13. Esquema de un ribosoma donde se observa el ARN ribosomal.

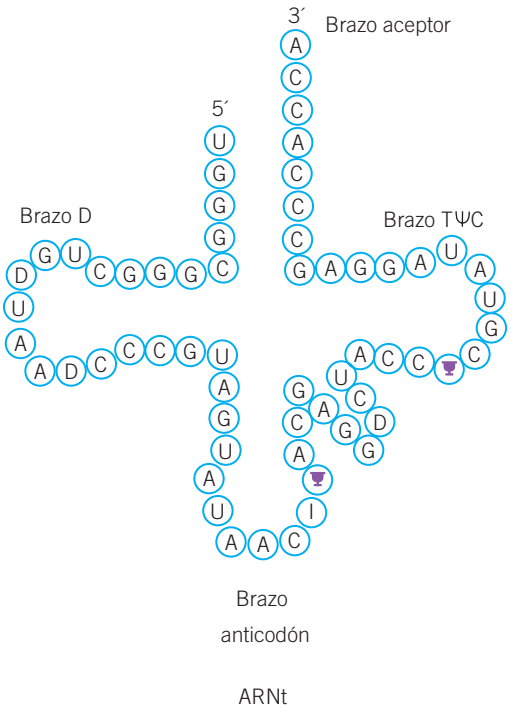


Figura 3-14. Estructura secundaria del ARN de transferencia.

brazo donde se ubica la secuencia del anticodón que reconoce los codones del ARNm (figura 3-14).

ARN pequeño nuclear (ARNsn)

Es el ARN presente en el núcleo eucariote y está implicado en los procesos de maduración del ARNhn. En este proceso, el ARNsn se asocia a proteínas, formando las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPsn) que se encargan de eliminar intrones (fragmentos de ARNhn que no aparecen en el ARNm) (véase el capítulo 5). Cuando las RNPsn se unen al precursor del ARNm para eliminar los intrones se forma un complejo ARN-proteína de gran tamaño, visible en el microscopio electrónico, y que recibe el nombre de *espliciosoma (spliceosome)*.

Enzimas de ARN (ribozimas)

Estos ácidos ribonucleicos funcionan como catalizadores biológicos. Poseen, al igual que las enzimas, un sitio activo, uno de unión para el sustrato y uno de unión para un cofactor que puede ser un ion metálico. Los ARNsn involucrados en maduración del ARNhn son un ejemplo clásico de ribozimas.

siARN

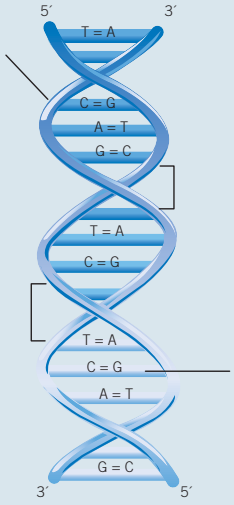
Moléculas de ARN de doble cadena de 20 a 25 nucleótidos que a través de la vía de interferencia de ARN de células suprimen la expresión de un gen específico. El siARN se une a una secuencia complementaria del ARNm, la unión del siARN con el ARNm produce la degradación enzimática del ARNm en células eucariotas de mamíferos y plantas. Las descubrió el grupo de David Baulcombe en Inglaterra, en 1999, y originalmente los describieron como parte del mecanismo de regulación génica postranscripcional en plantas.

miARN

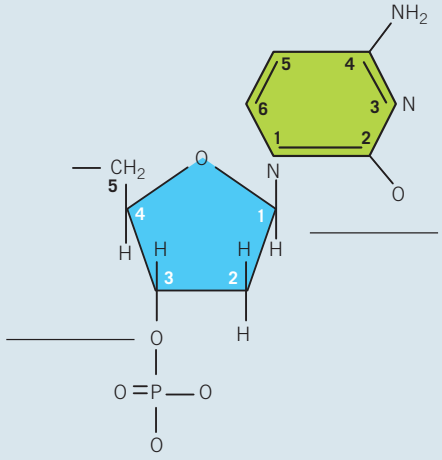
Se trata de moléculas de ARN de cadena sencilla de 21-23 nucleótidos en longitud encargadas de regular la expresión génica. Los miARN se unen a una secuencia complementaria del ARNm y bloquean la traducción. El miARN no es totalmente complementario a la secuencia del ARNm; en este caso, el ARNm no se degrada pero tampoco puede utilizarse para la síntesis de proteínas. Originalmente los describió el grupo de Victor Ambros en 1993 como *small* ARNs. El término *micro-ARN* fue introducido en 2001 por Ruvkun por la capacidad de los siARNs y miARNs para silenciar genes.

Ejercicios de integración

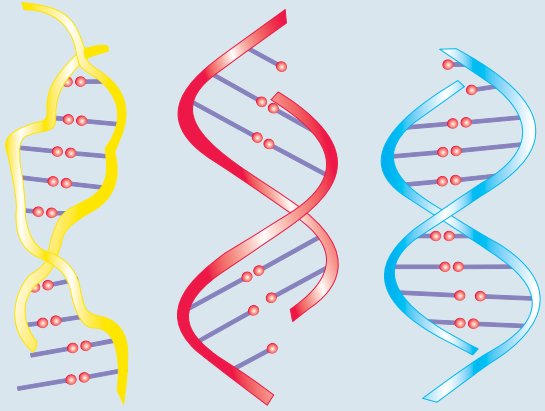
1. Escriba las características principales de la doble hélice de ADN.



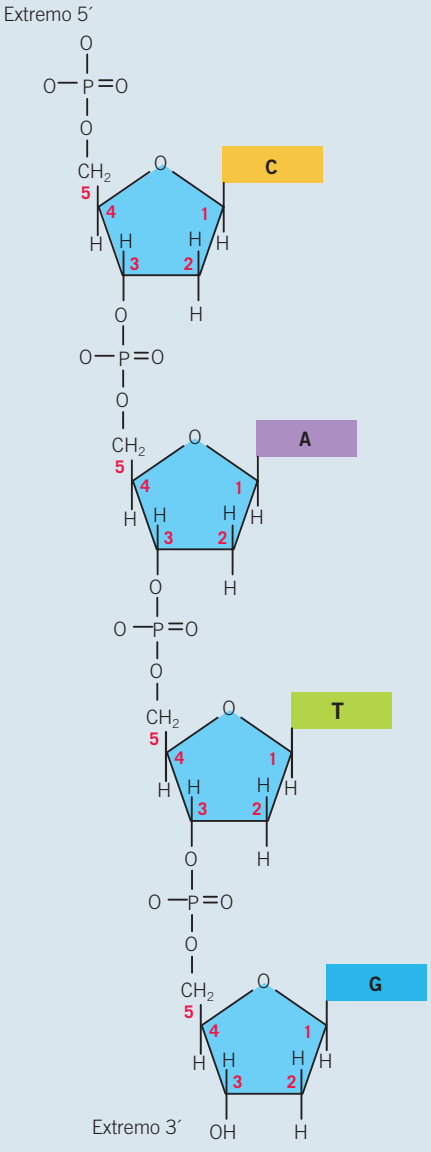
2. Mencione el tipo de enlace que une la pentosa con el grupo fosfato y el tipo de enlace que une la pentosa con la base nitrogenada.



3. De acuerdo con la estructura, identifique las variantes de la doble molécula de ADN: A, B y Z.



4. Dibuje la hebra complementaria de ADN con los puentes de hidrógeno correspondientes para cada base.



Bibliografía

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., et al. DNA y cromosomas. En: Alberts B., editor. *Introducción a la Biología Celular*, 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2010:171-193.

Chandar N., Viselli S. Organización del genoma eucariótico y expresión génica. En: Harvey R., editor. *Biología molecular y celular*, 1ª ed. Barcelona: Lippincott Williams and Wilkins, 2011:58-126.

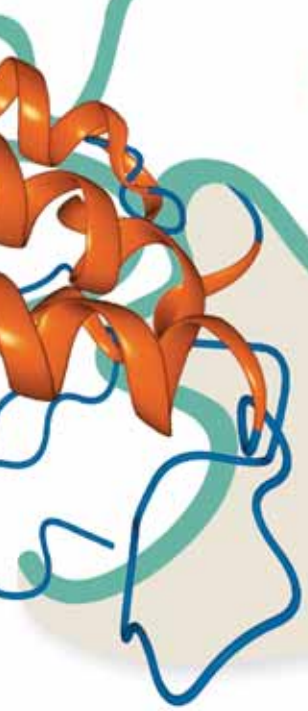
Harvey R., Ferrier D. *Almacenamiento y expresión de la información genética*. En: Harvey R., (ed). Bioquímica, 5ª ed. Barcelona: Lippincott Williams and Wilkins, 2011:395-465.

Karp G. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*, 6ª ed. México: McGraw-Hill, 2011:379-497.

Kutter C., Svoboda P. *miRNA, SiRNA, piRNA. RNA Biology*, 2008;5:181-188.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scott M., *et al.* Mecanismos genéticos moleculares básicos. En: Lodish H (ed). *Biología celular y molecular*, 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2006:101-123.

Luque J., Herráez A. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*, 1ª ed. Madrid: Harcout, 2001:10-88.



Capítulo 4

Replicación

Jorge Fernando Floresvillar Mosqueda / José Guadalupe Macías Barragán

Introducción

Una de las características más notables del ADN es su capacidad de replicarse; dicho de otra manera, tiene la capacidad de formar copias de sí mismo. La replicación se lleva a cabo en la fase de síntesis (S) del ciclo celular. Esta etapa es un paso obligado para realizar la división celular. Por ello, se determina que la información genética se transfiere de una célula a otra mediante el proceso de replicación del ADN.

El objetivo de la replicación es el de conservar la información genética. La representación estructural del ADN en doble hélice permite comprender cómo dicha molécula puede dar lugar a otras idénticas, sin perder su conformación. En principio, las dos hebras deberán separarse y, después, mediante la acción de una enzima, añadir desoxirribonucleótidos y, según la complementariedad de bases, construir ADN a partir de las dos hebras molde iniciales.

Características generales

La síntesis de las cadenas de ADN durante la replicación se lleva a cabo en dirección 5' → 3' tanto en eucariotes como en procariotes. Solamente el carbono de la posición 3' de la pentosa posee un radical hidroxilo (OH) libre, con el que puede formar un nuevo enlace fosfodiéster con otro desoxirribonucleótido y formar así la hebra creciente de ADN; por esta razón, la cadena de ADN sólo puede crecer en dirección 3'. A este proceso se le llama polimerización, que consiste en la unión de un dNTP (desoxirribonucleótido) complementario a la hebra molde según la Ley de Chargaff (véase el capítulo 1). La replicación del ADN cuenta con tres características que la definen y permiten entender el proceso: **semiconservadora, bidireccional y antiparalela**.

Semiconservadora

Se refiere a que en cada replicación una molécula de ADN recién sintetizada conserva una de las cadenas originales y la otra es sintetizada *de novo*.

Anteriormente existían tres teorías que trataban de explicar el proceso de la replicación; se decía que podía ser: semiconservadora, conservadora y dispersora o dispersante.

- **Semiconservadora** (modelo correcto). En cada una de las moléculas hijas se conserva una de las cadenas originales.
- **Conservadora**. Se sintetiza una molécula totalmente nueva, copia de la original, por lo que tras la duplicación quedan, por un lado, las dos hebras antiguas juntas y, por otro, las dos hebras nuevas.
- **Dispersora** o **dispersante**. Las cadenas hijas constan de fragmentos de la cadena antigua y fragmentos de la nueva.

El experimento definitivo para dilucidar cuál de estas tres hipótesis era la correcta lo realizaron Meselson y Stahl en 1957, y confirmó la hipótesis semiconservadora. Este experimento se basaba en dos premisas fundamentales: por una parte, el nitrógeno es uno de los principales elementos del ADN, ya que forma parte de las bases nitrogenadas, y por la otra, existen dos isótopos de este átomo, ^{14}N y ^{15}N, que pueden distinguirse mediante técnicas de laboratorio. Aunque el ^{14}N es el isótopo más abundante en la naturaleza, el ^{15}N también es viable y es más pesado, característica que permite diferenciarlos. Este experimento se realizó utilizando bacterias cuyo medio de cultivo contenía ^{15}N, por lo que todo su ADN también lo contenía. Después se les cambió el medio de cultivo por uno que contenía ^{14}N. Se permitió que las bacterias se replicaran sólo una vez y se extrajo el ADN que se analizó por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio, que permite separar las moléculas por tama-

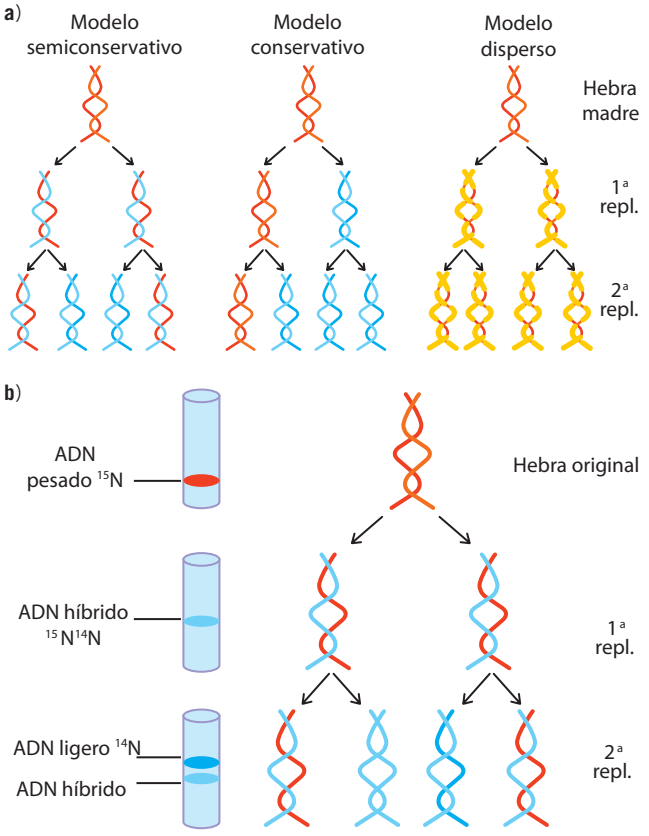


Figura 4-1. Teorías de la manera en que se replicaba el ADN. *A*, conservadora, semiconservadora y dispersante. *B*, experimento de Meselson y Stahl. Se concluyó en que la replicación del ADN era un proceso semiconservador.

ño o peso. El resultado mostró una sola banda con un peso intermedio ^{14}N y ^{15}N, lo que sugirió que la molécula resultante estaba compuesta de ^{14}N y ^{15}N. En la segunda replicación en medio con ^{14}N se observaron dos bandas, una correspondiente a ^{14}N (del ADN replicado en esta segunda división celular) y otra intermedia entre ^{14}N y ^{15}N de la mezcla ADN parental: ADN recién sintetizado. De esta forma, Meselson y Stahl demostraron el mecanismo correcto de la replicación del ADN (figura 4-1 A y B).

Bidireccional

La replicación del ADN en eucariotes es bidireccional, ya que a partir del sitio de origen (ORI, también llamados ARS en eucariotes), se sintetizan las dos cadenas en ambos sentidos, con dos puntos de crecimiento que forman lo que se conoce como *horquillas de replicación* (figura 4-2).

En organismos eucariotes, debido al gran tamaño del ADN, existen múltiples orígenes de replicación (sitios ORI), por lo que a la replicación se la considera *multifocal* (figura 4-3). Los sitios ORI son secuencias específicas ricas A y T y controlan la replicación de una unidad de ADN llamada *replicón*. La presencia de bases A:T facilita la separación de las hebras y la formación de la burbuja de replicación. En

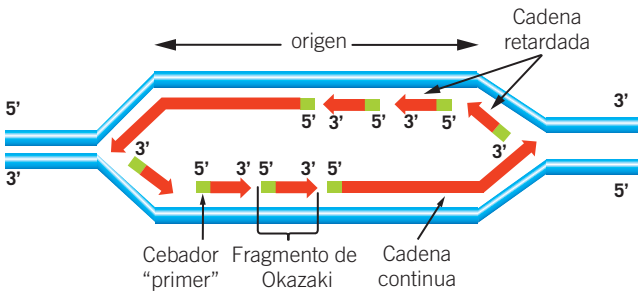


Figura 4-2. Replicación del ADN. Esta replicación es bidireccional.

los cromosomas de bacterias y virus existe un origen único de replicación por molécula de ADN; este sitio ORI permite la replicación de todo el ADN circular, por lo que se afirma que la replicación es *monofocal* (figura 4-4).

Discontinua

La replicación siempre se produce en sentido 5' → 3', y el extremo 3'-OH libre es el punto a partir del cual se produce la elongación del ADN. Esto plantea un problema: las cadenas tienen que crecer de forma simultánea a pesar de que son antiparalelas, es decir, cada cadena tiene el extremo 5' enfrentado con el extremo 3' de la otra cadena. Por ello, una de las cadenas debería sintetizarse en dirección 3' → 5'. Esta incógnita la resolvieron los científicos japoneses Reiji Okazaki y Tsuneko Okazaki en la década de 1960, al descubrir que una de las nuevas cadenas del ADN se sintetizaba en forma de fragmentos cortos que, en su honor, se denominan *fragmentos de Okazaki*. Su longitud suele variar entre 1000 y 2000 nucleótidos en las bacterias y entre 100 y 400 nucleótidos en eucariotes. La cadena que se sintetiza en el sentido que avanza la horquilla de replicación se denomina *hebra adelantada*, *líder* o *conductora (leading strand)*, y se

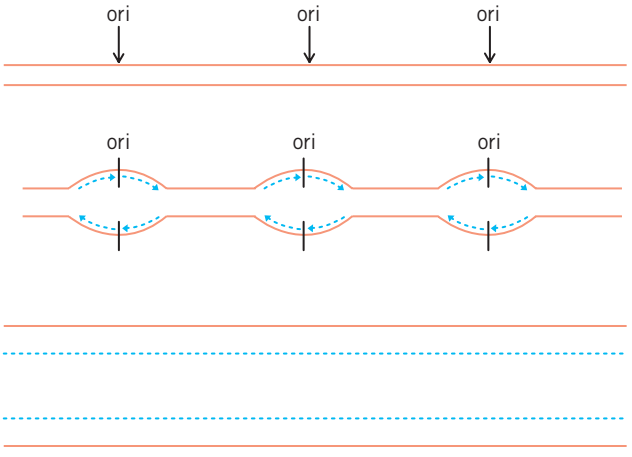


Figura 4-3. Replicación multifocal. La replicación en eucariotes contiene múltiples sitios ORI, que se replican simultáneamente, lo que permite acortar el tiempo en el que se replica todo el ADN.

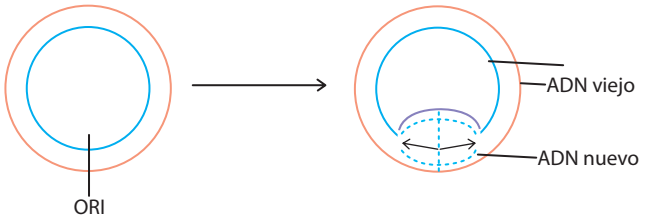


Figura 4-4. Replicación monofocal. En eucariotes, el único cromosoma existente contiene un solo sitio de replicación ORI. A este tipo de replicación se le llama monofocal.

sintetiza de forma continua por la ADN polimerasa, mientras que la que se sintetiza en sentido contrario al avance de la horquilla se denomina *hebra rezagada* o *retrasada (lagging strand)*, cuya síntesis se realiza de forma **discontinua** o en fragmentos, y para disponer de una cierta longitud de ADN molde para continuar hay que esperar a que la horquilla de replicación avance (cuadro 4-1).

Proteínas que participan en la replicación

La maquinaria encargada de la replicación del ADN es muy compleja y está formada por un grupo de proteínas que actúan en conjunto con una secuencia de ADN específica ya establecida. A continuación se describen las enzimas que intervienen en el proceso de replicación y enseguida se desarrollará el proceso mencionando las enzimas involucradas.

Helicasa: enzima encargada de separar las dos hebras del ADN mediante la rotura de los puentes de hidrógeno que se establecen entre las bases nitrogenadas de las dos cadenas del ADN. Ocasiona superenrollamientos positivos a los lados de la burbuja de replicación.

Proteínas de unión a cadena sencilla (SSB, *single-strand ADN binding proteins en procariotes y RPA en eucariotes*): evitan la formación de los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas separadas por la helicasa y permiten que se copien.

Topoisomerasas: son enzimas isomerasas que actúan sobre la topología del ADN, pueden cortar o formar enlaces fosfodiéster ya sea una de las hebras *(topoisomerasa I)* o en las dos *(topoisomerasa II)* que forman el ADN. Esta escisión selectiva permite al ADN liberar la tensión contorsional, con lo que se deshace el superenrollamiento, el cual en caso de persistir detendría la replicación. De esta manera se permite el acceso a la cadena de ADN a todas las enzimas involucradas en la replicación.

Primasa: es una enzima que sintetiza pequeños fragmentos de ARN de entre 8 y 10 nucleótidos de longitud, conocidos como cebadores o *primers*, complementarios a un fragmento del ADN. La unión de los cebadores al ADN proporciona un extremo 3´ necesario para que la ADN polimerasa (enzima que sintetiza ADN y que no puede añadir nucleótidos si no existe un extremo 3´libre) lleve a cabo su acción. Los cebadores, al ser ARN, luego son degradados por las nucleasas Rnasa H1 y sustituidos por ADN por acción de otra ADN polimerasa.

Rnasa H1: enzima encargada de retirar los cebadores de ARN durante la síntesis de los fragmentos de Okazaki y en los procesos de reparación del ADN.

FEN1/RTH1: también llamada endonucleasa *flap* 1 *(flap endonuclease 1)*, se encarga de remover el ribonucleotido 5' del fragmento de Okazaki. El Nick (falta de enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos adyacentes) resultante es sellado por la ADN ligasa.

Ligasa: enzima que cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre nucleótidos contiguos.

Telomerasa: es una ribonucleoproteína con actividad de ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa) capaz de sintetizar una secuencia determinada de ADN que permite el alargamiento de los telómeros (extremos de los cromosomas eucariotes).

Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA): es un homotrímero que forma una estructura de toroide, la cual es abierta transitoriamente por acción del factor de replicación C (RFC, replication factor C), lo que permite su

Cuadro 4-1. Diferencias en la replicación entre procariotes y eucariotes.

Lugar	Procariotes	Eucariotes
	Citoplasma	Núcleo y mitocondria
Número de orígenes de replicación	1	Núcleo 10^3 a 10^4 Mitocondria 2
Tiempo de replicación del genoma (h)	~0.67	8
Proteínas implicadas	~30	Cientos
ADN polimerasas	3	5
Inicio	Origen único	Origen múltiple
Otros materiales	Cebador, dNTPs	Cebador, dNTPs
Formato	Semiconservadora	Semiconservadora
Tasa de replicación	1 000 nucleótidos/s	100 nucleótidos/s

Cuadro 4-2. Propiedades de la ADN polimerasa de eucariotes.

	α	β	γ	δ	ε
Compartimiento celular	Núcleo	Núcleo	Mitocondria	Núcleo	Núcleo
Primasa asociada	Sí	No	No	No	No
Función biológica	Replicación hebra retardada	Reparación del ADN	Replicación del ADN mitocondrial	Replicación hebra conductora	Replicación adicional
Núm. de subunidades	4	1	4 isoformas	2	¿?
Peso molecular Subunidad catalítica	165 a 185	40	125	125	210 a 230

recircularización alrededor de la doble hélice del ADN a la altura del extremo del primer en la cadena líder. La estructura toroide del PCNA alrededor de la cadena de ADN permite su libre desplazamiento por la misma. PCNA interactúa con la ADN polimerasa, sirviendo como una pinza que sostiene a la polimerasa en el extremo del primer y le permite sintetizar la cadena de ADN.

ADN polimerasa: son las principales enzimas en este proceso. Son capaces de sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir de una hebra patrón o molde y las unidades estructurales correspondientes (desoxirribonucleótidos). Una característica importante de esta enzima es que añade los nucleótidos en la dirección 5' → 3' siempre y cuando haya un extremo 3' disponible. Como consecuencia de esto, la dirección en la cual leerá la cadena molde de ADN será de 3' → 5'.

En eucariotes se han descrito por lo menos cinco ADN polimerasas involucradas en la replicación del ADN, cada una con una actividad específica: α, β, γ, δ y ε. La polimerasa α (ADNpol α), también llamada primasa, inicia la síntesis del ADN mediante la formación de un cebador ARN. Las polimerasas δ y ε (ADNpol δ y ADNpol ε) son responsables de la mayor parte de la elongación de ambas hebras del ADN. La polimerasa β (ADNpol β) no interviene en la replicación y está involucrada en la reparación de errores o daños en el ADN. Es importante mencionar que las polimerasas α, β, δ y ε están involucradas en la replicación del ADN nuclear. La polimerasa γ (ADN pol γ) lleva a cabo la replicación del ADN mitocondrial. Existen otras polimerasas, como las polimerasas ζ (theta), η (eta) y ι (iota), cuya función no es muy conocida, pero se cree que están involucradas sobre todo en mecanismos de reparación y recombinación.

De las 5 polimerasas, sólo tres tienen la actividad de exonucleasa-3' (pol δ, γ y ε), esto es, son capaces de corregir los errores cometidos al incorporar los nucleótidos a la hebra que se está sintetizando, eliminan el nucleótido equivocado y añaden el correcto. Ninguna ADN polimerasa en eucariotes presenta actividad de exonucleasa-5'. En procariotes la ADN pol I presenta este tipo de actividad.

A diferencia de lo observado en eucariotes, en la maquinaria para la replicación de los procariotes, sólo tres enzimas participan en la síntesis del ADN. La polimerasa I es la única que tiene actividad de exonucleasa de 5' a 3'.

En el cuadro 4-2 se resumen las propiedades de la ADN polimerasa en eucariotes y en el 4-3, las de procariotes.

Fases de la replicación

Para su estudio y mejor comprensión, como la mayoría de los procesos celulares la replicación se ha dividido en tres fases: inicio, elongación y terminación.

Cuadro 4-3. Características de la polimerasa de procariotes.

	ADN Pol I	ADN Pol II	ADN Pol III
Peso molecular (daltons)	109 000	90 000	900 000
Constitución	Monómero	Monómero	Multímero asimétrico
Polimerasas/célula	400	Desconocido	10 a 20
Actividad/función			
Polimerasa 5' a 3'/elongación	Sí	Sí	Sí
Exonucleasa 3' a 5'/correctora	Sí	Sí	Sí
Exonucleasa 5' a 3'/reparación	Sí	No	No

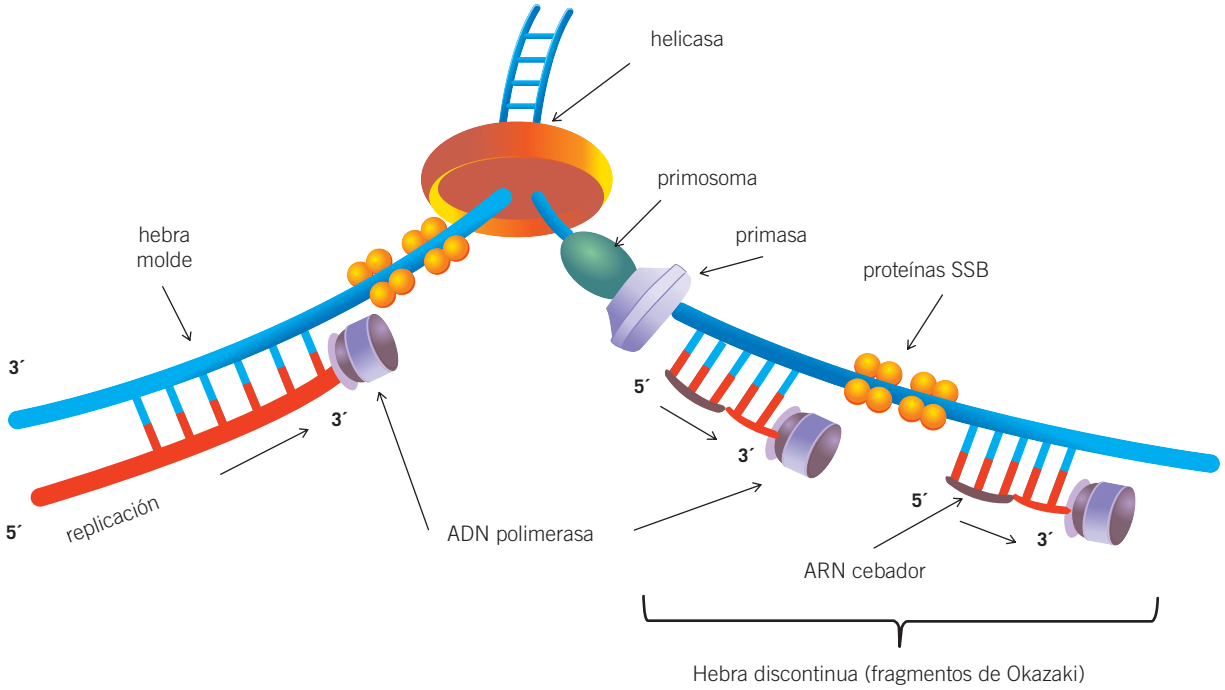


Figura 4-5. Inicio de la replicación del ADN. Se observan las cadenas continua y discontinua; ambas se replican en dirección de 5' a 3'.

Inicio

Las zonas en el ADN donde se producen las burbujas de replicación no son aleatorias, se sabe que existen secuencias de aproximadamente 300 pb que indican los lugares precisos donde ha de comenzar la replicación. Estos sitios son ricos en A y T y son reconocidos por una serie de proteínas llamadas, en conjunto, *proteínas de reconocimiento del sitio de origen*. En eucariotes, los orígenes de replicación se llaman secuencias de replicación autónoma (SRA).

Cada burbuja de replicación posee dos horquillas de replicación, una de las cuales se desplaza hacia la derecha y otra hacia la izquierda. El proceso de replicación necesita, en primera instancia, que las dos cadenas del ADN se separen. Para esto, la **helicasa** se unirá a la cadena de ADN e hidrolizará los puentes de hidrógeno. La apertura de la doble hélice hace que las cadenas simples adquieran inestabilidad, que se compensa por la unión de proteínas estabilizadoras **RPA**. La ADN polimerasa no puede iniciar la síntesis a partir de los desoxirribonucleótidos libres; por lo tanto, necesita que la **primasa** sintetice un **cebador**, a partir del cual la ADN polimerasa incorporará los nucleótidos en forma complementaria a las bases de la cadena patrón (figura 4-5).

Elongación

Es el proceso por el cual la ADN polimerasa añade nucleótidos uno por uno complementarios a la cadena molde, a medida que avanza la horquilla, ayudada por **PCNA**. La función del PCNA es mantener la ADN polimerasa en contacto con la cadena molde, con la finalidad de que la lea y sintetice la cadena complementaria.

Una vez presente la maquinaria de inicio de la replicación, la horquilla avanza, aumentando la tensión por delante de la cadena. Para evitar que esta tensión impida el avance de la horquilla, las topoisomerasas (I y II) cortarán los enlaces fosfodiéster de la doble hélice y volverán a unirla, lo que permitirá que se desenrolle una vuelta si actúa la topoisomerasa I y dos si lo hace la topoisomerasa II.

Como ya se ha mencionado, la síntesis es diferente en cada una de las hebras de la horquilla de replicación; en la cadena líder, la síntesis se realizará en forma continua, y por el contrario, en la cadena retrasada, la síntesis se realizará en forma discontinua. Una de las consecuencias de la síntesis discontinua es que para la síntesis de cada fragmento de Okazaki se requiere de un cebador intercalado entre estos fragmentos, mientras que en el caso de la cadena continua es necesaria la presencia de un solo cebador. El proceso de elongación es similar en eucariotes que en procariotes (figura 4-6).

Terminación

El final de la replicación se produce cuando la ADN polimerasa δ llega al extremo del fragmento de ADN. Se produce entonces el desacoplamiento de todo el replisoma y la finalización de la replicación. Uno de los pasos cruciales en el proceso de terminación es completar la síntesis de la cadena retardada y unir los fragmentos de Okazaki. A este pro-

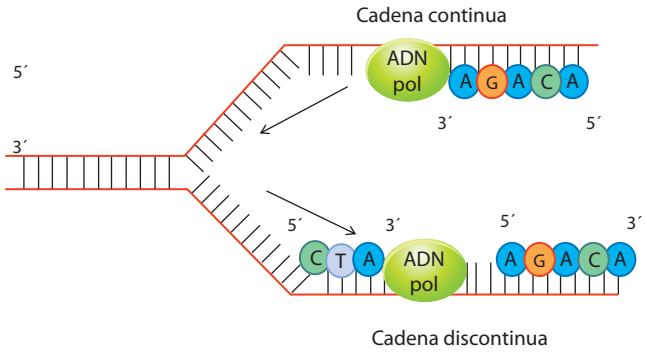


Figura 4-6. Elongación de la replicación del ADN. La cadena continua va en sentido de la horquilla, y la discontinua, al lado contrario y siempre sintetizando en dirección 5' a 3'.

ceso se lo denomina *maduración*, y requiere la eliminación de los cebadores, la elongación del fragmento de ADN adyacente para rellenar el espacio que quedó por la eliminación del cebador y la unión de los extremos resultantes para formar una cadena continua. Para que esta maduración suceda, existe un sistema de nucleasas (FEN1/RTH1 + RNasa H1) encargado de eliminar el cebador de ARN. En consecuencia la ADNpol δ, o ADNpol ε, elonga el extremo 3' del fragmento adyacente y rellena el lugar que antes ocupaba el cebador hasta alcanzar el extremo 5' del fragmento contiguo. Por último, la ADN ligasa I sella la mella resultante uniendo el 3'-P del primer fragmento con el 5'-P del segundo.

Replicación de los telómeros. La fase final de la terminación de la replicación del ADN consiste en la replicación de los telómeros de las cadenas de ADN. Los telómeros son secuencias repetidas de 1-5 unidades T y G en una de las cadenas, y por lo tanto, C y A en la complementaria situadas en los extremos de los cromosomas eucariotes (los procariotes no poseen telómeros porque su ADN es circular). La dinámica de replicación que requiere de un primer para polimerizar no permite completar la copia de los extremos de la hebra de síntesis retrasada de ADN, al no poderse situar un cebador más allá del final de la secuencia. De esta manera, al retirar todos los cebadores de las cadenas de ADN de síntesis retrasada recién sintetizadas; en cada una de las dos moléculas de ADN uno de los extremos queda más corto. La telomerasa es una transcriptasa inversa formada por ARN (9 a 28 nucleótidos) y proteína que contiene un fragmento de la secuencia de su ARN complementario a la secuencia de los telómeros. Por lo tanto, en la replicación de los telómeros actúan las telomerasas, que se unen por complementariedad de bases a los

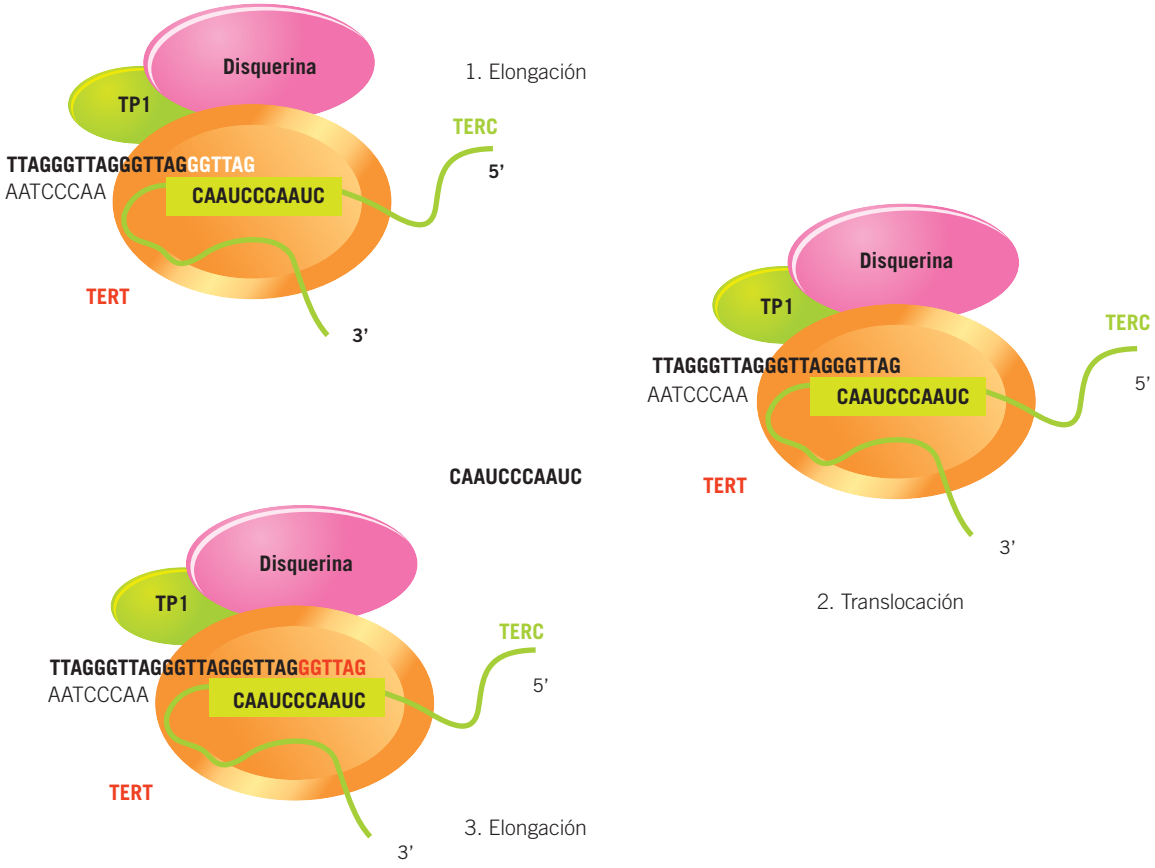


Figura 4-7. Función de la telomerasa en sus tres fases: elongación, translocación y elongación.

telómeros y sintetizan los extremos de los cromosomas más allá de su tamaño, tomando como molde el ARN de la transcriptasa inversa.

La telomerasa sólo está presente en células somáticas, tejidos fetales y en ciertas células madre. En eucariotes la presencia de la telomerasa en las células germinales garantiza la preservación de las largas secuencias teloméricas. La desaparición de la enzima en las células somáticas condiciona la longitud de estas secuencias y puede alterar la división celular correcta, el tiempo de vida de una célula y, por extensión, del organismo. El acortamiento de los telómeros se ha vinculado con el envejecimiento (figura 4-7).

El mecanismo de acción de la telomerasa se detalla a continuación (figura 4-7):

1) La telomerasa se une a su respectiva secuencia complementaria y alarga el extremo saliente 3', una vez que éste se encuentra alargado. Se produce un apareamiento de bases entre el ADN telomérico y el ARN de la telomerasa.
2) Con este apareamiento empieza la primera elongación. La telomerasa cataliza la elongación del extremo 3' alargado, añadiendo dNTPs y empleando como molde la hebra de ARN de la propia telomerasa.
3) Una vez que se están añadiendo los dNTPs, la telomerasa se desliza sobre el extremo 3' previamente elongado, conservando la complementariedad gracias a la repetición de secuencias, lo que se conoce como translocación.
4) La telomerasa elonga nuevamente el extremo 3' saliente.
5) Se vuelven a repetir los pasos de translocación y elongación.
6) En la segunda fase la ADN polimerasa α rellena la otra hebra, y la ligasa sella la mella que queda en la elongación.

Replicación mitocondrial

La replicación del ADN mitocondrial en mamíferos se ajusta al modelo del lazo de desplazamiento o *lazo D*. Las dos hebras del ADN mitocondrial se pueden diferenciar según su densidad, y existe una hebra ligera (L) y otra pesada (H). En primer lugar, se inicia la replicación o síntesis de la nueva hebra L, sin que se comience la replicación de la nueva hebra H. El origen de replicación de la hebra L es diferente al de la hebra H, de forma que existen dos orígenes de replicación diferentes, uno para cada una. Además, una vez iniciada la replicación de la nueva hebra L, la síntesis es unidireccional y avanza desplazando a la otra hebra. Cuando se han sintetizado aproximadamente dos tercios de la nueva hebra L, comienza la síntesis de la nueva hebra H, en una sola dirección, opuesta a la de síntesis de la hebra ligera L. Por consiguiente, la síntesis de la nueva hebra L termina antes que la de la nueva hebra H (figura 4-8).

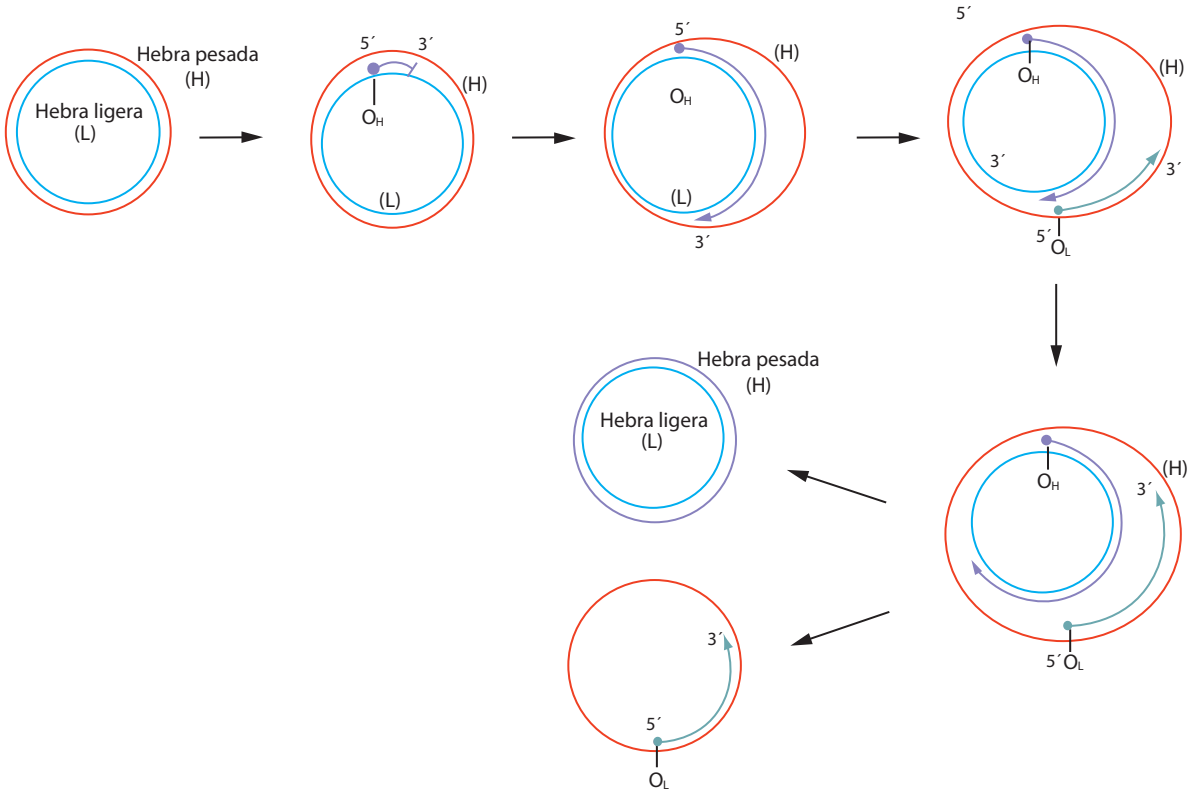


Figura 4-8. Replicación del ADN mitocondrial. (L) hebra ligera; (H) hebra pesada; (OH) origen de hebra pesada; (OL) origen de hebra ligera.

Preguntas de repaso

1. ¿En qué se distingue la síntesis de ADN entre eucariotes y procariotes?
   a) Los procariotes no requieren primasas.
   b) Los eucariotes poseen múltiples orígenes de replicación.
   c) Los procariotes poseen extremos teloméricos.
   d) Las ADN polimerasas eucariotes sintetizan ADN de 3' → 5'.
2. Las ADN polimerasas I y III de *E. coli* se distinguen entre sí gracias a:
   a) Su distinta actividad de exonucleasa 3' → 5'.
   b) Su procesividad y la actividad de exonucleasa 5' → 3'.
   c) Que una posee actividad de exonucleasa y la otra no.
   d) Que una posee actividad de primasa y la otra no.
3. La secuencia en la que las diferentes enzimas actúan durante la replicación del ADN en procariotes en la hebra retrasada es:
   a) ADN ligasa, primasa, ADN polimerasa III, ADN polimerasa I, helicasa.
   b) Helicasa, primasa, ADN polimerasa I, ADN polimerasa III, ADN ligasa.
   c) Helicasa, primasa, ADN polimerasa III, ADN polimerasa I, ADN ligasa.
   d) Helicasa, ADN polimerasa I, primasa, ADN polimerasa III, ADN.
4. La telomerasa es un complejo formado por:
   a) ARN y proteína.
   b) ADN y proteína.
   c) Doble cadena de ADN y proteína.
   d) Doble cadena de ARN y proteína.
5. Este tipo de ADN polimerasa está involucrada en la replicación de la mitocondria:
   a) α
   b) β
   c) ζ
   d) γ
   e) η

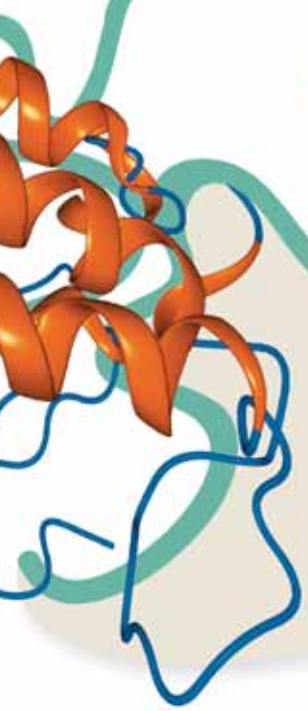
Bibliografía

Gardner E.J., Simmons M.J., Snustad D.P. *Principios de Genética*, 7ª ed. Willey Liss, 2002:130-156.

Lewin B. *Genes IX*, 9ª ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 2007:428-456.

Luque J., Herráez Á. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Madrid: Harcourt, 2001:141-160.

Watson J.D., Baker T.A, Bell SP, *et al*. *Biología molecular del gen*, 5ª ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2005:23-45.



Capítulo 5

Transcripción

Zamira Helena Hernández Nazará

Transcripción

Una de las funciones de la doble cadena del ADN, representada en el dogma de la Biología Molecular, es expresar la información contenida en el material genético. El primer paso en la expresión génica es la **transcripción**, que consiste en la síntesis de una cadena de ARN complementaria y antiparalela, a la secuencia de nucleótidos de una de las cadenas de ADN denominada *cadena molde*, y por lo tanto, tiene la secuencia de nucleótidos idéntica a la cadena opuesta del ADN llamada cadena codificadora, con la premisa de que la timina se sustituye por uracilo en la molécula de ARN (figura 5-1).

La transcripción es el paso previo y necesario para la generación de proteínas funcionales que definen el metabolismo y la identidad de las células. Las secuencias de ADN que se copian en cada proceso de transcripción se denominan *genes* (figura 5-2). Desde el punto de vista molecular, el gen es una secuencia lineal de nucleótidos en la molécula de ADN, que contiene la información necesaria para la síntesis de un ARN funcional, que puede ser ARNm, ARNt o ARNr. Los genes se sitúan a lo largo de cada cromosoma en una posición determinada llamada *locus*. Se estima que el número de genes que se encuentra en la especie humana es de aproximadamente 23 000; sin embargo, todavía no se tiene certeza acerca del número exacto. La definición de gen propuesta por Gerstein y colaboradores lo describe como un conjunto de secuencias que codifican para potenciales productos funcionales que se sobreponen entre sí y que pueden estar localizadas en más de un *locus* en el ADN.

Estructura del gen

El mecanismo de transcripción en células eucariotas, aunque transcurre de manera similar que en procariotas, es un proceso mucho más complejo; tanto el número de proteínas y enzimas como la diversidad y la estructura de los genes son considerablemente mayores, por lo que se requiere de una regulación más precisa. La mayoría de los genes en procariotes están organizados en operones, esto es, un conjunto de genes situados en el mismo fragmento de ADN que se transcriben como una unidad y que generan varios productos funcionales que participan en una vía metabólica común; aunque también pueden existir unidades que codifiquen para un solo producto funcional. Por el contrario, en los eucariotes, se transcribe generalmente un solo producto génico (unidades transcripcionales monocistrónicas) con mayor complejidad en su regulación.

Los genes eucariotes están constituidos por secuencias regulatorias y codificantes. El inicio del sitio de transcripción se denomina +1, y la numeración aumenta conforme se dirige al extremo 3'. Esta dirección se conoce como *corriente abajo*, donde se encuentran las secuencias codificantes del gen. Hacia el extremo 5', en la dirección opuesta, conocida como *corriente arriba,* la numeración se indica como −1, y es allí donde se encuentra la mayoría de regiones regulatorias del gen (figura 5-3).

La región codificadora del gen también contiene regiones que no serán traducidas, denominadas *intrones*, y que son retirados por medio del proceso corte y empalme del ARNm primario o heterogéneo nuclear (ARNhn). Las regiones que codifican para el producto génico se conocen como *exones*. Un solo gen puede sintetizar diferentes proteínas mediante el arreglo de los exones por el proceso de corte y empalme alternativo. El tránscrito primario o ARNhn es el producto inmediato de la transcripción y consiste en un ARN que contiene las secuencias intrónicas y exónicas, cuyos extremos 5' y 3' no han sufrido ninguna modificación. El producto final, ARN mensajero maduro, ARN ribosomal (ARNr) y ARN transferencia (ARNt), se produce cuando sucede una serie de modificaciones en el tránscrito primario: modificaciones postranscripcionales. En proca-

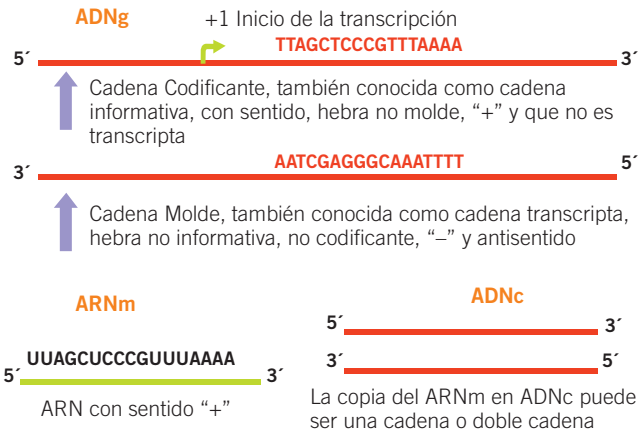


Figura 5-1. Transcripción: proceso de síntesis de ARN a partir de ADN. La molécula de ARN formada es complementaria y antiparalela a la molécula de ADN 5' → 3' a la que se le llama molde, y de secuencia idéntica a la cadena de ADN 5' → 3', denominada codificante.

riotes, el ARN recién sintetizado no sufre modificaciones postranscripcionales y se utiliza para la traducción de forma inmediata sin sufrir ningún proceso.

Un tipo de secuencias de ADN regulatorias que no codifican para el producto génico, pero regulan su expresión, son los promotores. El promotor mínimo es la región regulatoria indispensable para la transcripción del gen. Las secuencias adyacentes a este promotor mínimo forman parte de él, y pueden modificar la tasa de transcripción del gen, pero no son imprescindibles para la unión de la ARN polimerasa.

El promotor basal es la secuencia mínima requerida para la unión de la maquinaria basal de transcripción y para la ARN pol II (ARN polimerasa II) incluye el Inr y la caja TATA o el DPE.

A los promotores se les unen proteínas reguladoras conocidas como *factores transcripcionales* (*transcriptional factors*, TF), cuya función es regular (aumentar o disminuir) la tasa de transcripción. Aunque existe mucha diversidad entre los promotores reconocidos por la ARN polimerasa II se pueden definir secuencias consensos comunes entre sí. Una secuencia consenso es la región conocida como iniciador (Inr) localizada entre las posiciones –3 y +5. La secuencia consenso denominada **caja TATA,** debido a su composición de ocho pb A-T, se encuentra en la mayoría de los promotores y se localiza a –31 a –25 bp hacia el extremo 5' del punto de inicio. Éste es el único elemento que se localiza en una dirección relativamente fija con respecto al punto de inicio. Los promotores que carecen de caja TATA se denominan *TATA menos*. Cuando existe una mutación en la caja TATA, el sitio de inicio de la transcripción cambia, ya que la ARN pol II al ser activada se sitúa en otro sitio (figura 5-4). El DPR *(downstream promoter element)* es un elemento común en los promotores TATA menos, se localiza de +28 a +32.

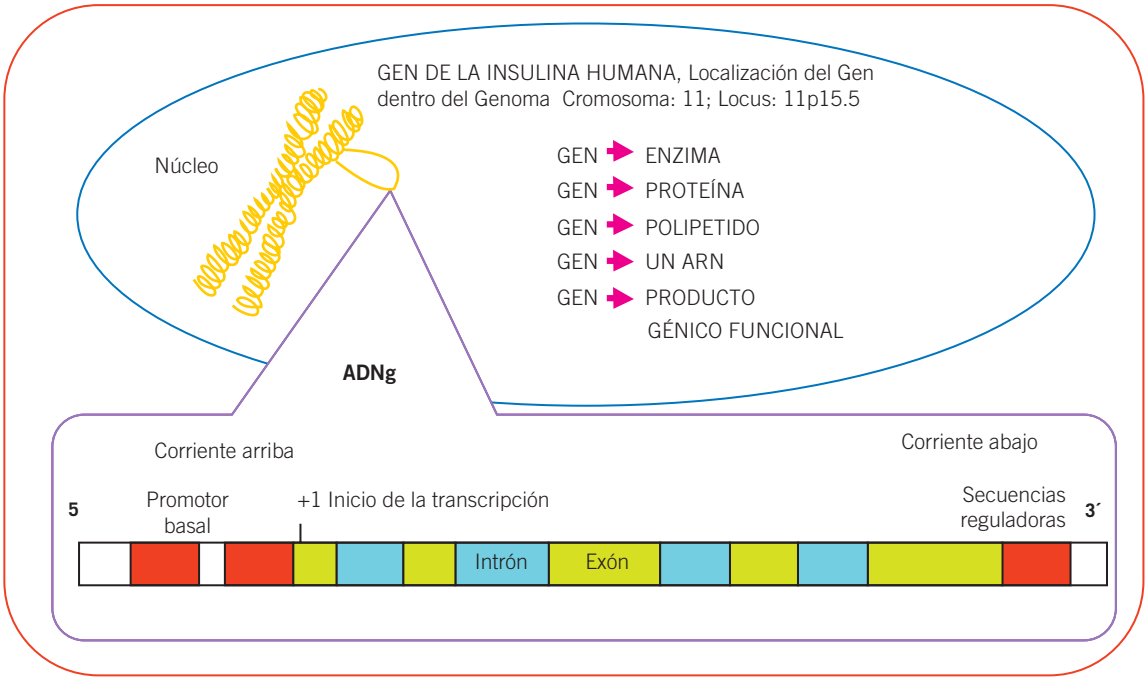


Figura 5-2. Gen: región del genoma que contiene la información necesaria para la síntesis de una molécula funcional o un rasgo particular. La localización de genes en el cromosoma es el *locus* (singular), *loci* (plural). La transcripción sucede en la interfase del ciclo celular y sólo ocurre sobre la conformación de 10 nm de ADNg cuando hay mayor acceso de las enzimas a la eucromatina.

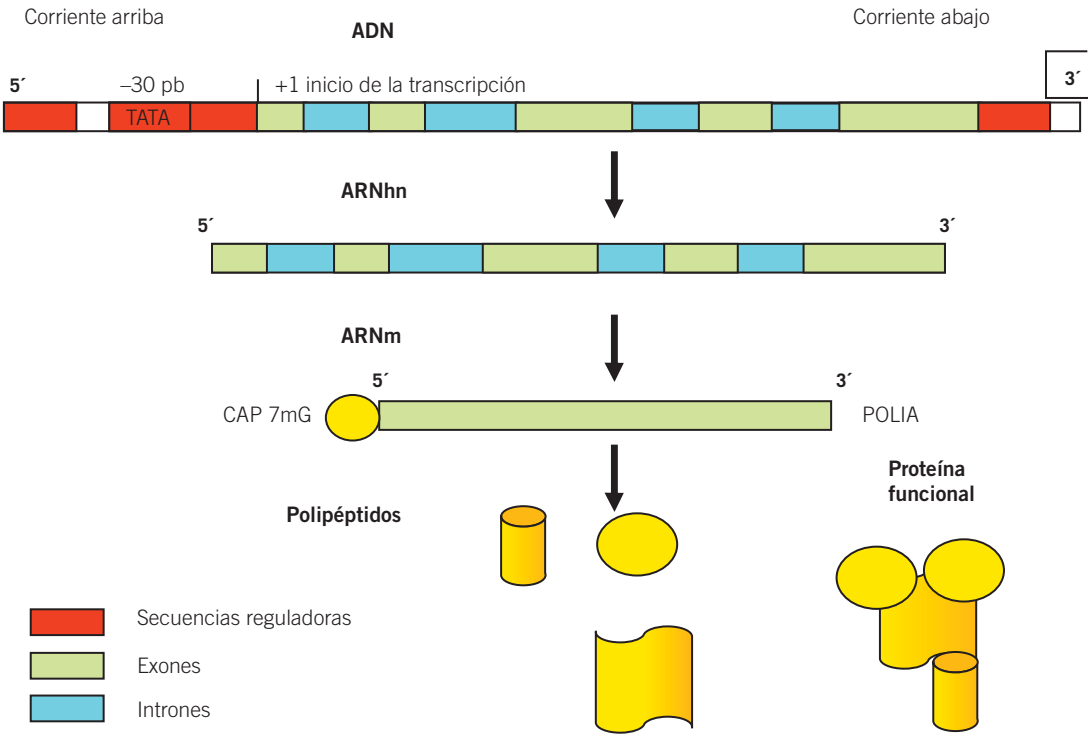


Figura 5-3. Procesamiento del ARN. A través de la transcripción de un gen se produce un ARNhn, que se procesa para dar lugar a un ARNm. Este ARNm sale del núcleo y en el citoplasma se traduce para dar lugar a proteínas que, a través de diversos procesos de maduración, darán lugar a proteínas funcionales.

Algunos promotores basales son fuertes, como la mayoría de los ubicados en los genes procariotes y virales; se les denomina así ya que la maquinaria de transcripción basal se une de forma eficaz y la tasa de transcripción es elevada. Otros son débiles, como la mayoría de los promotores de genes eucariotes, con un inicio de la transcripción menos frecuente, por lo que requieren secuencias accesorias contenidas en promotores proximales, localizadas generalmente a menos de 200 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Las cajas GC, CAAT y el **octámero** son ejemplos de estos promotores proximales, reconocidos por los factores transcripcionales específicos para favorecer la iniciación. El número y la posición de estos elementos varían entre los promotores de los diversos genes. La unidad de transcripción se refiere a la interacción de todas las secuencias funcionales o estructurales posibles, así como el complejo proteico formado de enzimas y TF que se requieran durante el proceso de la transcripción.

Otras regiones regulatorias que ayudan a los promotores débiles a iniciar la transcripción son los promotores distales, que generalmente se encuentran a más de 200 pb río arriba (región 5') del sitio de inicio de la transcripción, aunque también se han localizado hacia el extremo 3' (corriente abajo). Las regiones que controlan la transcripción de un gen no necesariamente tienen que estar cerca de la región codificadora. Estas regiones son mucho más complejas y pueden activar o desactivar genes.

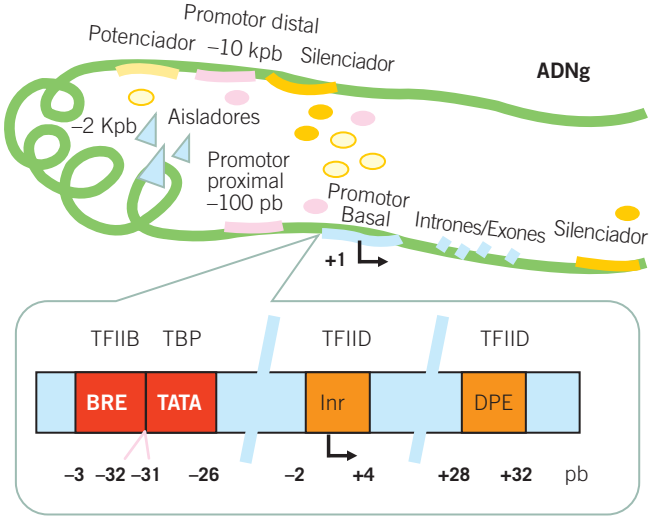


Figura 5-4. Secuencias que regulan la transcripción. Esquema del promotor basal y los factores transcripcionales que se unen a él y los otros elementos involucrados: promotor proximal; promotor distal; silenciadores; potenciadores y aisladores; elemento de respuesta para el TFIIB (BRE); caja TATA (TATA); elemento iniciador (Inr); elemento promotor corriente abajo (DPE); factor transcripcional IIB (TFIIB); factor de unión a la caja TATA (TBP), y factor transcripcional IID (TFIID). Pb: pares de bases.

Los potenciadores o secuencias amplificadoras (*enhancers*) son secuencias cortas que potencian o aumentan la transcripción del gen de manera cooperativa con otras secuencias reguladoras y alteran la estructura del ADN, ya que inducen el superenrollamiento en la zona del promotor basal y aumentan la unión de TF, lo que implica una aproximación física entre ambos y una flexibilidad en la molécula de ADN, y favorece el inicio de la transcripción.

Por otra parte, los silenciadores *(silencers)* son secuencias cortas de nucleótidos de dos tipos: los elementos silenciadores o los elementos de regulación negativa (*negative regulation elements*, NRE) y pueden actuar de varias maneras:

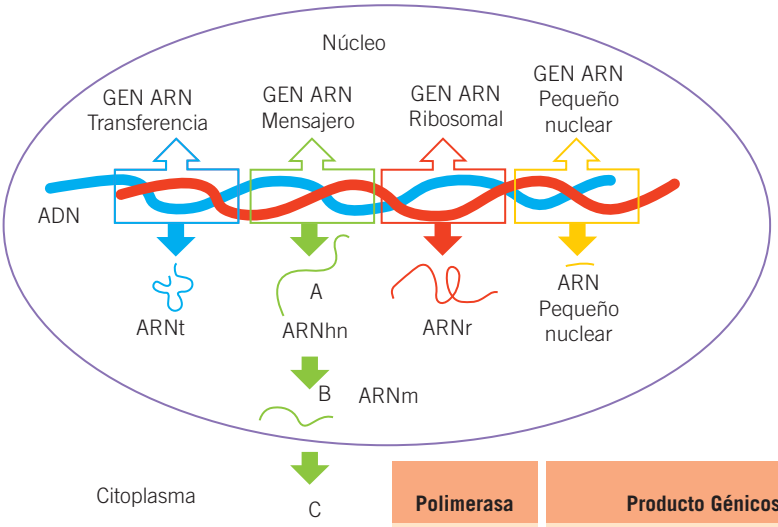
1. Modificando la estructura de la cromatina y evitando que los genes sean activados.
2. Reclutando factores transcripcionales represores y evitando que factores transcripcionales inductores se unan al ADN.
3. Alterando el proceso de corte y empalme del ARN heterogéneo nuclear y evitando su maduración.
4. Creando señales que bloquean la traducción, e inactivando así la expresión génica.

La acción de un potenciador o un silenciador puede inhibirse por la presencia de **secuencias aisladoras**, cuya función es bloquear la transmisión de la señal de un sitio a otro en el ADN e impedir el silenciamiento. La mayoría de los potenciadores o silenciadores actúan sobre el promotor que se encuentra vecino, sin ser específicos de un determinado gen.

Tipos de ARN polimerasa

La enzima protagonista en este proceso es la ARN pol, que sintetiza una cadena de ARN en dirección 5' → 3' al igual que la ADN pol. Esta enzima actúa de manera continua durante toda la unidad de transcripción: primero sobre el sitio de inicio indicado en el promotor basal, continúa en la secuencia codificadora y finaliza en una secuencia de terminación. En las células eucariotas los genes nucleares son transcritos por tres tipos de ARN pol: I, II y III, que transcriben diferentes tipos de genes en lugares específicos del núcleo. Cada una reconoce promotores y TF con características específicas. Las ARN pol de mitocondrias se asemejan más a la ARN pol bacteriana, dada la menor complejidad de los genomas de estos organelos (figura 5-5).

La ARN pol I reside en una zona definida del núcleo, el nucleolo, donde transcribe los genes que codifican para los ARNr. Esta enzima sintetiza un único tránscrito, el ARNr



Polimerasa	Producto Génicos	Localización	Factores transcripcionales
ARN pol-I	ARNr grande: 28S, 18S y 5.8S	Nucléolo	TFI
ARN pol-II	ARN, ARNm, ARNsn	Nucleoplasma	TFII
ARN pol-III	ARN pequeño: 5S, ARNt	Nucleoplasma	TFIII

Figura 5-5. Enzimas productoras de ARN. La síntesis de todos los tipos de ARN se lleva a cabo en el núcleo por enzimas específicas donde la ARN pol I sintetiza el ARNr; la ARN pol II, el ARNm, y la ARN pol III, el ARNt y el ribosomal 5s. Después de su maduración son transportados al citoplasma para su función.

45S, precursor de los ARNr 18S, 28S y 5.8S. La ARN pol III se encuentra en el nucleoplasma y es la encargada de la síntesis de los ARNt, el ARNr 5S y otros pequeños ARN (*small nuclear,* ARNsn).

La **ARN pol II** también se encuentra en el nucleoplasma y sintetiza las moléculas de **ARNhn**, el precursor del ARNm y algunos ARNsn. Existen tres subunidades comunes para las tres ARN pol: en primer lugar, una subunidad grande, el dominio terminal carboxilo (*carboxy terminal domain*, CTD), que puede ser altamente fosforilada en los residuos de serina y treonina, y es muy importante en el inicio de la transcripción, en el corte y empalme, en la modificación de los extremos del ARN y en la terminación. Las otras dos subunidades son las de reconocimiento de la secuencia de ADN y la del sitio catalítico.

Factores transcripcionales (generales y específicos)

La producción de ARNhn por la ARN pol II requiere de una regulación mucho más compleja, donde el número y el tipo de factores de transcripción involucrados es mayor. Como se mencionó anteriormente, los TF son proteínas que se unen al ADN en el promotor, potenciador o silenciador para el control de la expresión de los genes. Éstos se unen al ADN reconociendo una secuencia específica, aunque una misma secuencia puede ser reconocida por más de un TF, que puede ser activador o represor. Los TF se han clasificado, de acuerdo con su función, en factores transcripcionales generales o basales y factores transcripcionales inducibles.

Factores transcripcionales (TF) generales o basales

Son los requeridos para el inicio de la transcripción en todos los promotores basales. Se unen a la ARN pol para formar un complejo que rodea el sitio de inicio, determinando la iniciación. Los TF toman el nombre de la ARN pol con la que actúan y, junto con ésta, forman el aparato básico de transcripción. Por lo tanto, los TF que actúan con la ARN pol I se denominan TF I; los que actúan con la ARN pol II, TF II, y los que actúan con la ARN pol III, TF III.

Factores transcripcionales inducibles

El conjunto de TF requerido para la expresión de un determinado gen es particular para cada promotor. Los TF inducibles, o TF de tejido específico, interactúan con el ADN de la misma manera que los TF generales, pero su función es más bien reguladora y se unen preferentemente a los promotores distales. Se sintetizan o activan bajo un estímulo y controlan la transcripción en tiempo y espacio. Un gen con un promotor que contenga secuencias reconocibles sólo por los TF generales puede transcribirse en cualquier tipo celular y éstos son los responsables de la expresión de genes que se expresan constitutivamente. En cambio, los genes controlados por TF inducibles requieren de la formación de un complejo mediador estimulado de forma aleatoria.

Proceso de transcripción

La transcripción tiene lugar en el núcleo. En el sitio de inicio de la transcripción, la molécula de ADN se separa de forma transitoria en dos cadenas sencillas y una se utiliza como molde para la síntesis de ARN, formando una burbuja *(burbuja de transcripción)*. Conforme la ARN pol avanza y copia el ADN, el ADN ya copiado se vuelve a unir a su cadena complementaria y forma nuevamente la doble hélice, liberando el ARN como una cadena sencilla de nucleótidos (sólo los últimos 25 nucleótidos sintetizados forman complejo con el ADN). La reacción de transcripción se divide en tres etapas: **iniciación**, **elongación** y **terminación**.

El reconocimiento del promotor basal, o preiniciación, de la transcripción inicia con la unión de la primera proteína del complejo del TFIID a la caja TATA, conocida como proteína de unión específica de TATA (*TATA binding protein*, TBP). La TBP tiene la capacidad inusual de unirse al ADN por el surco menor donde lo dobla. Esta unión provoca una deformación en la estructura del ADN sin separar las dos cadenas. Es el componente clave en el posicionamiento de la ARN pol II y delimita la distancia desde el punto de inicio hasta la caja TATA. En los promotores que carecen de caja TATA, la TBP puede incorporarse por asociación a otras proteínas que reconocen el ADN. El TFIID está formado, además de por la TBP**,** por 11 TAF *(TBP associated protein)*. Los TAF son subunidades diferentes y pueden reconocer una variedad de promotores tanto basales como distales. Estas proteínas desempeñan un papel fundamental en el nexo entre el aparato basal de transcripción y los otros factores 5' y TF reguladores, para formar el complejo mediador de la unidad transcripcional (figura 5-6).

El TFIIA controla la capacidad de unión de TBP al ADN y permite al TFIID reconocer la región que se extiende hacia el extremo 5'. El TFIIB es otro factor que se une de forma adyacente a TBP, específicamente en la secuencia del promotor basal BRE y proporciona mayor superficie de reconocimiento para el anclaje de la ARN pol II. El TFIIF es el medio de unión de la ARN pol II al complejo de transcripción.

La proteína TFIIH tiene actividad helicasa y contacta con la ARN pol II, lo que le permite su anclaje a ésta. La burbuja de transcripción se origina mediante un desenrollamiento local, que se inicia en el sitio de unión de la ARN pol II. En el caso de promotores débiles, en este paso tiene lugar el ensamblaje de todas las proteínas necesarias para iniciar la síntesis.

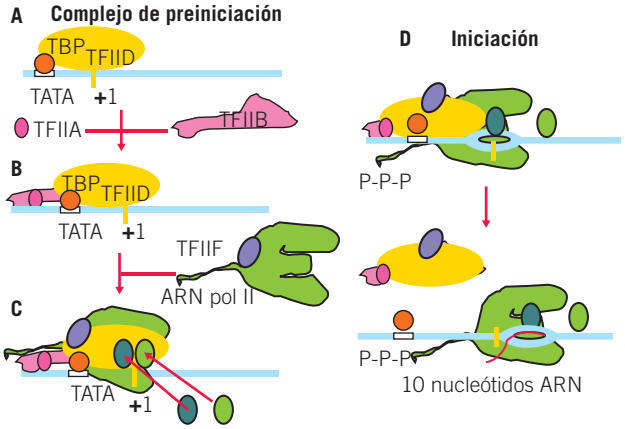


Figura 5-6. Iniciación de la transcripción. A, en la etapa de preinicio la proteína de unión a la caja TATA, TBP, interactúa con el surco menor del ADN, activando el complejo de preinicio y curvando la doble hélice. TBP forma parte del TFIID. **B**, TFIIA controla la capacidad de unión de TBP al ADN y permite a TFIID reconocer la región que se extiende hacia el extremo 5'. TFIIB proporciona una mayor superficie de reconocimiento para el anclaje de la ARN pol II. **C**, formación del complejo entre TFIIF y la ARN pol II. La ARN pol queda colocada sobre el sitio de inicio de la transcripción. Se une TFIIE que recluta a TFIIH. TFIIH tiene actividad de helicasa y desnaturaliza al ADN, exponiendo la secuencia nucleotídica a la ARN pol II. Inicio *D*, se refiere a la síntesis de los primeros 10 enlaces nucleotídicos del ARN. El extremo CTD de la ARN pol II es fosforilado en varias posiciones. La ARN pol II se suelta de todos los factores de transcripción, y sólo TBP queda unido a la caja TATA.

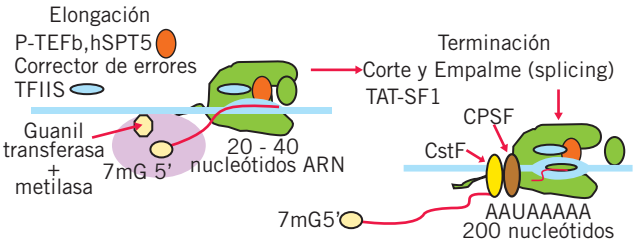


Figura 5-7. Elongación: en esta etapa la ARN pol II se libera del promotor en presencia de TFEII y TFHII, además de los factores de elongación PTEFb y TFIIS, que evitan la terminación prematura. TFIIS (elonguina) participa en la reparación en caso de que un nucleótido no sea apareado correctamente. hSPT5 es un factor de procesamiento del extremo 5'. Terminación: implica la formación de la señal de poliadenilación y terminación AAUAAAAA y la adición de la cola de poli-A en el tránscrito de ARN, así como la separación del complejo de transcripción. Los procesos de elongación y terminación son simultáneos. El factor CPSF es específico de la poliadenilación. El factor CstF participa en la escisión. El complejo proteico TAT-SF1 recluta el ayustosoma.

1. **Inicio**. El inicio se refiere a la síntesis de los primeros enlaces nucleotídicos de ARN. La ARN pol II permanece en el promotor mientras sintetiza los primeros nueve enlaces. La fase de inicio puede retrasarse por la ocurrencia de intentos abortivos, en los que la enzima sintetiza pequeños fragmentos (menos de nueve bases) y los libera, y vuelve a iniciar nuevamente. El inicio termina cuando la enzima comienza a alargar la cadena y abandona el promotor con el complejo de iniciación (figura 5-6).
2. **Elongación**. La fase de elongación requiere de las proteínas TFIIE y TFIIH, que se unen corriente arriba de la ARN pol II; ambas se requieren para iniciar su movimiento a lo largo del ADN y el abandono del promotor basal. Una vez unida TFIIE, se pueden unir TFIIH, que excepcionalmente continúa unido a la ARN pol II y tiene varias actividades: ATPasa, helicasa y cinasa, que puede fosforilar el dominio CTD de la ARN pol II. La fosforilación del dominio carboxiterminal (CTD) está implicado en el abandono del promotor basal y el inicio de la fase de elongación. En la elongación, la enzima ARN pol II se mueve a lo largo del ADN y sintetiza la cadena naciente de ARN. A medida que la enzima avanza sobre el ADN, lo desenrolla para exponer un nuevo segmento de cadena sencilla de ADN, que fungirá como molde. Los nucleótidos se añaden de forma covalente al extremo 3'OH y en la región desenrollada se forma un híbrido ADN-ARN (figura 5-7)
3. **Terminación**. La terminación de la transcripción implica el reconocimiento de una secuencia que contiene una región rica en GC, en una serie de seis o más adeninas contenidas en el tránscrito de ARN. En la transcripción del ARN se leería como la señal de poliadenilación que determina el final de la adición de nucleótidos a la cadena y la desintegración del complejo de transcripción. Se presume que este proceso puede ser mucho más complejo. Cuando se añade el último nucleótido a la burbuja de transcripción se colapsa al desaparecer el híbrido ADN-ARN, y se libera la ARN pol II. Es importante mencionar que existe una superposición de eventos, de tal manera que los procesos de elongación, terminación y maduración del ARNhn son simultáneos, por lo que cuando termina la transcripción ya existe un ARNm maduro y listo para transportarse al citoplasma (figura 5-7).

Procesamiento del ARN

El tránscrito primario, o ARNhn, tiene que procesarse de diversas formas para su maduración antes de exportarse del núcleo y participar en el proceso de traducción. El proceso de maduración incluye la adición de un capuchón de guanina modificada en el extremo 5', la poliadenilación del extremo 3', el corte y empalme, además del proceso de edición que sucede sólo en algunos genes (figuras 5-7 y 5-8).

El extremo 5' se modifica cuando el ARN es apenas un polímero de 20 a 40 ribonucleótidos, por la adición de una

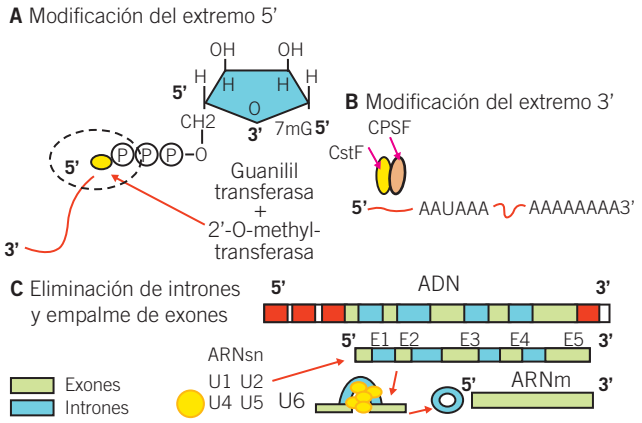


Figura 5-8. A, adición de la caperuza o casquete en el extremo 5'. La base modificada 7 metilguanosina (7mG) se añade en 2'-OH de la última base del Marne, eliminando un grupo fosfato con la formación de un enlace entre carbono 5'-5' de las ribosas. **B**, modificación del extremo 3' con la adición de la cola de Poli A en presencia de los factores CPSF y CstF, al reconocer la secuencia AAUAAA presente en el ARNm. **C**, eliminación de intrones y empalme de exones (*splicing*), con la formación del ayustosoma con ataque nucleofílico y transesterificación.

7-metil-guanosina, en tres pasos enzimáticos: la eliminación de un grupo fosfato (enzima ARN trifosfatasa); la adición del nucleótido guanina (enzima guanilil transferasa), y por último, su metilación (enzima metil transferasa). Las tres enzimas son reclutadas por el factor de elongamiento hSPT5 unido al CTD de la ARN pol II. La 7-metil guanosina queda unida a través de un enlace entre carbono 5'-5' de las ribosas (figura 5-8A).

La etapa de la terminación de la transcripción y la adición de la cola de poliadenilación (poli-A) en el extremo 3' están íntimamente ligadas. El CTD de la ARN pol II, de igual manera, participa en el reclutamiento de las enzimas para la poliadenilación que sucede al encontrar secuencias de reconocimiento en el ARN tránscrito primario en tres procesos:

1. Los complejos proteicos, el factor estimulante de la escisión (*cleavage stimulation factor,* CstF) y el factor específico de poliadenilación y escisión (*cleavage and polyadenylation specificity factor*, CPSF), transferidos desde CTD al ARNhn, lo escinden.
2. Adición de alrededor de 200 residuos de adenina en el extremo 3' por la enzima poli-A polimerasa. Es importante mencionar que la cola de poli-A sólo se añade a los ARN generados por la ARN pol II; es decir, los que presentan la señal de poliadenilación AAUAAA.
3. La ARN pol II continúa añadiendo nucleótidos antes de colapsar la burbuja de transcripción, por lo que la señal de poliadenilación es clave para el proceso de terminación (figura 5-8B).

Corte y empalme *(splicing)*

El proceso de corte y empalme *(splicing)* consiste en la remoción de los intrones (las secuencias intragénicas no codificadoras de la región codificadora) y el empalme de los exones (bloques de secuencias codificadoras para formar el ARNm maduro). Los exones y los intrones pueden empalmarse en más de una forma y generar variantes del ARNm por corte y empalme alternativo. Las regiones en el ARNhn reconocidas por la maquinaria de corte y empalme son secuencias conservadas de nucleótidos específicas que limitan los exones y los intrones, e indican dónde se realizará el corte y el empalme, sitio de empalme 5' y 3' (donante y receptor, respectivamente); una tercera secuencia, conocida como *sitio de ramificación,* se encuentra en la secuencia del intrón. Las enzimas del proceso también conocido como *ayustosoma* median dos reacciones de transesterificación sucesivas donde se rompen y se forman dos enlaces fosfodiéster nuevos. El ayustosoma está formado por 150 proteínas y 5 ARN nucleares pequeños (ARNsn), conocidos como U1, U2, U4, U5 y U6; por lo tanto, es una riboproteína. Las reacciones se pueden dividir en tres etapas:

1. Identificación de las secuencias donantes 5' y sitio de ramificación por U1 y U2, respectivamente, ayudado por proteínas accesorias.
2. Formación de un plegamiento del ARN para acercar los tres sitios de corte y empalme, ayudado por U4, U5 y U6; en este momento, se produce el ataque nucleofílico de la adenina conservada en el sitio de ramificación en el enlace fosfodiéster de una guanina conservada del sitio donante 5', formando un nuevo enlace fosfodiéster y una estructura llamada *lazo intrónico*.
3. Liberación de U1. Es remplazado por U6. En la segunda reacción de transesterificación el sitio donante 5' libre se convierte en un nucleófilo que ataca el sitio receptor 3'. Los exones se empalman y liberan el lazo intrónico. En este momento se libera U4 y entran en contacto U6 y U2, y la unión de los exones es mediada por U5. El ayustosoma es constantemente reciclado y reclutado por el CTD de la ARN pol II a través del TAT-SF1 (figura 5-8C).

Edición del ARN

La edición es una forma de modificación postranscripcional del ARNm. En algunos casos genera el cambio de un aminoácido importante por otro o codones de paro de la traducción y la generación de una proteína truncada. El proceso de edición sólo se presenta en ciertos genes, en algunos tejidos o en algunos tipos celulares. Existen dos mecanismos que median la edición: la desaminación oxidativa de una citosina metilada, que se convierte en uridina del codón CAA (enzima citidina desaminasa) y genera el codón de paro UAA, o el cambio de aminoácido adenina por inosina, que prefiere aparearse con citosina (enzima

adenosina desaminasa de acción sobre ARN, ADAR), mecanismo propio de los mamíferos, incluido el ser humano. La inserción o deleción de una uridina dirigida por un ARN guía se ha observado en procariotes, y ha cambiado los marcos de lectura para la traducción. El ejemplo más representativo del proceso de edición es en el ARNm de la apoliproteína B (ApoB). El ARNm sintetizado en el hígado produce una cadena polipeptídica de 100 aminoácidos, por lo que se lo conoce como ApoB-100. Este mismo gen en el intestino, al ser tránscrito, sufre un proceso de edición, en el que una citosina en la posición 2152 es desaminada y se convierte en U, cambiando el codón CAA por UAA, un codón de terminación que provoca la formación de una proteína truncada de tan sólo 48 aminoácidos denominada ApoB-48.

Regulación de la transcripción

Las diferencias fenotípicas que caracterizan a las diferentes células presentes en organismos multicelulares, a pesar de tener el mismo genotipo, se deben a la expresión diferencial de sus genes. El desarrollo y el fenotipo de un organismo pueden regularse por el producto génico que interactúa con otros genes o con el ambiente en tiempo y espacio. Existen diversos mecanismos por los cuales se puede controlar la expresión de los genes (véase el capítulo 7).

Preguntas de repaso

1. ¿Cuál es la definición molecular que describe mejor un gen?
   a) Locus específico del ADN que contiene información y almacenamiento para la descendencia.
   b) Secuencia del ADN que contiene la información para la síntesis de ARN.
   c) Secuencia del ADN específica de unión a proteínas necesarias para la función celular.
2. ¿Qué diferencias existen en la transcripción entre eucariotes y procariotes?
   a) Mayor complejidad en la regulación, se realiza en el núcleo, requiere procesamiento del ARN, son genes monocistrónicos.
   b) Se realiza en el citoplasma, son genes policistrónicos, no requieren procesamiento del ADN.
   c) Menor complejidad en la regulación, se realizan en el citoplasma, traducción y transcripción de manera simultánea.
3. Esquematiza (dibuja) la secuencia de eventos de la transcripción.
4. Son funciones del dominio proteico CTD de la ARN pol II:
   a) Regulación negativa, formación de la burbuja de transcripción y síntesis de ribonucleótidos.
   b) Enzima metiltransferasa, colapso de burbuja de transcripción y sitio de unión al ADN.
   c) Reclutamiento de las enzimas, función de ATPasa y helicasa.
5. ¿Cuáles son las modificaciones del ARNhn que lo convierten en un ARNm?
   a) Superenrollamientos, modificación del extremo 3' con una guanina metilada.
   b) Poliadenilacion del extremo 3', corte de los intrones y empalme de los exones.
   c) Formación de estructuras secundarias, corte de los exones y empalme de los intrones.

Bibliografía

Aphasizhev R. RNA uridylyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, 2005;62:2194-2203.

Armstrong J.A. Negotiating the nucleosome: factors that allow RNA polymerase II to elongate through chromatin. *Biochem Cell Biol*, 2007;85:426-434.

Gerstein M.B., Bruce C., Rozowsky J.S., Zheng D., Du J., Korbel J.O., *et al*. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Research*, 2007;17:669-681.

Gu M., Lima C.D. Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. *Curr Opin Struct Biol*, 2005;15:99-106.

Kornblihtt A.R., De la Mata M., Fededa J.P., Muñoz M.J., Nogues G. Multiple links between transcription and splicing. *RNA*, 2004;10:1489–1498.

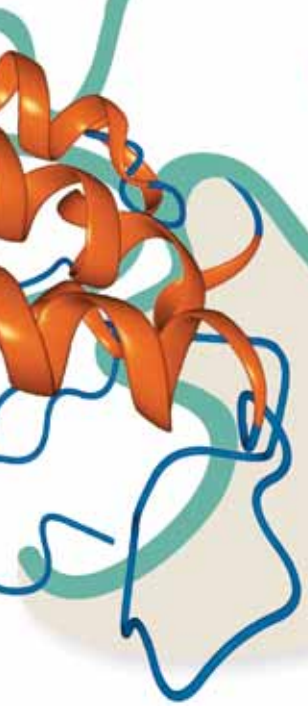
Nechaev S., Adelman K. Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim Biophys Acta*, 2011;1809:34-45.

Pennisi E. Genomics. DNA study forces rethink of what it means to be a gene. *Science*, 2007;316:1556-1557.

Phatnani H.P., Greenleaf AL. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev*, 2006;20:2922-2236.

Pheasant M., Mattick J.S. Raising the estimate of functional human sequences. *Genome Res*, 2007;17:1245-1253.

Tarn W.Y. Cellular signals modulate alternative splicing. J *Biomed Sci*, 2007;14:517-522.



Capítulo 6

Traducción

José María Vera Cruz / Bertha Adriana Álvarez Rodríguez
Belinda Claudia Gómez Meda

Introducción

Se sabe que las características físicas son heredadas de nuestros padres (estatura, color de ojos), así como también la predisposición a padecer y/o desarrollar ciertas enfermedades, a las que se denominan hereditarias (diabetes, diferentes tipos de cáncer, etc.), y esto se logra a través de la información contenida en los genes. Esta información se almacena en el cromosoma y se transmite de célula a célula mediante el mecanismo de replicación del ADN (útil para la perpetuidad de la información genética) y se expresa a través de la transcripción mediante la obtención del ARN, principalmente el ARN mensajero (ARNm), necesario para traducir esta información para la síntesis de una proteína funcional y específica.

Traducción

Se conoce como traducción a la síntesis de una proteína de acuerdo con la información genética y se emplea como molde una molécula de ARNm.

Se llama traducción porque interpreta la información contenida en el gen utilizando un código genético a través del cual desarrolla una lectura de la secuencia de nucleótidos contenidos en el ARNm. Esta conversión de información se conoce como "decodificación", y se considera extremadamente exacta (con un error de aproximadamente 5×10^{-4} por residuo de aminoácido) y rápida (incorpora aproximadamente 15 aminoácidos por segundo, a 37°C de temperatura). Este fenómeno es uno de los procesos más complejos que se realizan dentro de la célula; en él participan numerosos factores traduccionales de manera coordinada y consume gran cantidad de energía (aproximadamente el 80%, en forma de adenosín trifosfato [ATP] y 20% de guanoín trifosfato [GTP]) que la célula produce.

La cadena molde que la traducción requiere para su inicio es el ARNm, que se codifica por el código genético con una secuencia de 64 codones diferentes. El modo de lectura del ARNm es igual al observado en la transcripción, el cual tiene como inicio el extremo 5' y finaliza en el extremo 3', de tal manera que permite crecer una cadena peptídica partiendo de un extremo N-terminal para finalizar en un extremo C-terminal. A la principal reacción de la traducción se la conoce como *polimerización*, que es la adición secuencial de aminoácidos (según la información genética), uno tras otro, mediante la formación de enlaces peptídicos.

Código genético

Un gen contiene la información necesaria para transcribirse en un ARNm, que a su vez puede expresarse como una proteína. Esta expresión se da debido a que las instrucciones trasladadas del ADN al ARN y en especial del ARNm a las proteínas se transmiten en forma de códigos.

El ADN está formado por cuatro bases nitrogenadas (A, C, G, T). Si se representara cada aminoácido por un nucleótido específico no se podrían formar los 20 aminoácidos que están presentes en las proteínas; de igual forma, agrupar nucleótidos de dos en dos, permitiría formar hasta 16 combinaciones posibles, pero seguiría siendo insuficiente. Así, la forma en la que se codifica la información es en grupos de tres nucleótidos, lo que conforma un triplete, o codón, que representará un aminoácido o señal específica que la célula interpreta durante el proceso de traducción. De esta manera, ya que se dispone de cuatro bases diferentes, se tienen 64 diferentes combinaciones posibles de tres nucleótidos (4^3), 61 de los cuales codifican para aminoácidos y tres marcan la terminación de la traducción, lo que permite asignar de manera adecuada un código de tres bases (o varios) para la formación de cada uno de los 20 aminoácidos presentes en las proteínas y así poder descifrar el mensaje genético contenido en el ADN.

Figura 6-1. Código genético. Representado por tripletes de nucleótidos que son utilizados para descifrar a cada uno de los 20 aminoácidos que se encuentran en las proteínas eucariotas. La columna del lado izquierdo indica el primer nucleótido de cada triplete, la fila de la parte superior representa el segundo nucleótido y la columna del lado derecho indica el tercer nucleótido de cada triplete. Este códice del gen es el que se lee para traducir el mensaje genético por medio del complejo traduccional, para expresar una proteína.

Este sistema de códigos se denomina *código genético* (figura 6-1), el cual muestra de manera práctica los 64 codones y su significado, a fin de poder interpretar la información de una secuencia dada. La forma de agrupar estas combinaciones se fundamenta en elegir una de las bases de cada sección de la tabla, que se organizan en orden de derecha a izquierda y de arriba abajo; es decir, se lee primero la base de la columna de la izquierda, después la base de la fila superior, seguida de la base de la columna de la derecha, para de esta manera formar cada triplete.

Este código genético es utilizado por la célula para sintetizar proteínas a través del proceso de traducción, donde la secuencia de nucleótidos del ARNm, que a su vez representa la secuencia del ADN, se lee en grupos de tres (CGU, GAA, etc.), de modo secuencial y sin interrupciones, para convertirse en una secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, la expresión de una proteína está dada por el orden en que se encuentran los nucleótidos en el ADN, que determina el ordenamiento que se tiene al momento de ser transcrito a un ARNm y, por ende, define la secuencia de aminoácidos que tendrá una proteína.

Características del código genético

El código genético es específico y continuo, ya que cada codón tiene un significado único y los códigos se leen de manera continua y lineal; esto es, cada base puede pertenecer sólo a un codón, de tal forma que no hay duplicación ni omisión de ningún nucleótido en la lectura, y por lo tanto no hay sobreposicionamiento.

El código genético es redundante pero no ambiguo. Hay aminoácidos codificados por más de un codón (exceptuando los codones para los aminoácidos metionina y triptófano), y en general, en estos casos los codones se parecen entre sí y difieren sólo en el tercer nucleótido, de manera tal que este nucleótido presenta una baja especificidad, lo que se denomina "degeneración" de la tercera base en la mayoría de los codones. Entonces se dice que una base es cuatro veces degenerada si, con cualquiera de las bases nitrogenadas presente en una posición específica, el resultado es que codifique el mismo aminoácido, como sería el caso de la alanina, en la cual los codones que codifican para este aminoácido deben contener GC como primera y segunda base; sin embargo, la tercera base puede ser cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas, sin cambiar el sentido de la lectura.

Por esta razón, una característica del código genético es ser degenerado (cuadro 6-1), debido a que de los 64 codones que se conocen, 61 son utilizados para codificar a los 20

Cuadro 6-1. Degeneración del código genético. Es una característica del código genético y se refiere a que existen más codones distintos de los necesarios para guardar la información genética.

Aminoácido	Número de codones que codifican para el aminoácido	Aminoácido	Número de codones que codifican para el aminoácido
Metionina	1	Tirosina	2
Triptófano	1	Isoleucina	3
Asparagina	2	Alanina	4
Aspartato	2	Glicina	4
Cisteína	2	Prolina	4
Glutamina	2	Treonina	4
Glutamato	2	Valina	4
Histidina	2	Arginina	6
Lisina	2	Leucina	6
Fenilalanina	2	Serina	6

Cuadro 6-2. El código genético es casi universal. Se le considera así, porque es el mismo para todos los organismos existentes, con excepciones mínimas, observadas en mitocondrias y en algunos protistas.

Organismo	Codón	Código nuclear	Código mitocondrial
Todos	UGA	Paro	Trp
Levadura	CUX	Leu	Tre
Drosophila sp.	AGA	Arg	Ser
Humano y bovino	AUA	Ile	Met
Humano y bovino	AGA y AGC	Arg	Paro

tipos diferentes de aminoácidos. Cuando un aminoácido puede ser traducido por dos, tres, cuatro y hasta seis codones diferentes, estos tripletes son conocidos como "sinónimos", y no todos pueden ser reconocidos por el mismo anticodón, por lo que en estos casos se observan dos o tres ARNt distintos, que pueden transportar el mismo aminoácido, pero con diferentes anticodones.

Los tres codones restantes (UAA, UGA y UAG) tienen la función de terminar la traducción de una secuencia nucleotídica; esto es, que una vez que se ha agregado el último aminoácido que conforma la proteína en la cadena polipeptídica, mandan señales de paro para detener el proceso de traducción e informar a la célula que la síntesis proteica ha finalizado. Estos tripletes reciben el nombre de *codones de terminación*, *de paro* o *sin sentido*.

Otra característica del código genético es su universalidad, ya que hasta hace poco se consideraba que desde las bacterias hasta el hombre, la interpretación de los codones por aminoácidos era igual en todas las células de todas las especies, es decir, que todas "leen" los genes de la misma manera. Hoy por hoy, se conoce que esto no es totalmente cierto, ya que se han encontrado excepciones en las mitocondrias humanas, en otros mamíferos y en ciertas bacterias. Por tanto, es más correcto afirmar que el código genético es casi universal (cuadro 6-2).

Componentes del complejo traduccional

La traducción ocurre en el citoplasma de la célula, con la formación del **complejo traduccional**, formado por tres tipos de ARN, mensajero (ARNm), de transferencia (ARNt) y ribosomal (ARNr).

El **ARNm** es una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que contiene la información genética almacenada en el ADN y su secuencia es complementaria a una de las cadenas del ADN, a la que se la llama cadena molde. Presenta una disposición de tripletes de nucleótidos o codones, esto es, que están agrupados de tres en tres de manera secuencial, los cuales determinan la secuencia de aminoácidos en la proteína. Dicho de otro modo, esta molécula se obtiene mediante la transcripción, en la cual secuencias específicas de ADN son copiadas a ARNm, que transporta al citoplasma el mensaje contenido en el ADN a los sitios de síntesis proteica (los ribosomas).

Las moléculas de **ARNt** son de pequeño tamaño con estructura de bucles y son los ARN encargados de transportar al aminoácido hasta el ARNr, donde serán unidos, uno tras otro, mediante enlaces peptídicos. La enzima aminoacil-ARNt-sintetasa es la encargada de dicha unión, en un proceso que consume ATP. Los ARNt contienen en su secuencia al **anticodón**, un triplete de bases que se encuentra en el asa central del ARNt, en las posiciones 34, 35 y 36, que se une de manera complementaria con el codón del ARNm, durante la síntesis de una proteína, con la finalidad de introducir un aminoácido específico a la cadena polipeptídica naciente.

El dominio del anticodón está implicado de manera lejana en la discriminación entre las formas de iniciación y elongación del ARNt y en las funciones alternas del ARNt, tales como la iniciación de la transcriptasa inversa en los retrovirus.

El **ARNr** es el tipo de ARN más abundante en las células y forma parte de los **ribosomas**, que son las estructuras citoplasmáticas responsables de la biosíntesis proteica.

Como los otros ARN, el ARNr está formado por una sola hebra nucleotídica, con bases complementarias en algunas regiones, lo que le permite adquirir una estructura secundaria especial. Se denomina según su coeficiente de sedimentación, medido en Svedbergs (S) y, de esta manera, en organismos procariotas existen tres ARNr distintos: 5S, 16S y 23S y en organismos eucariotas cuatro: 5S, 5.8S, 18S y 28S.

El ARNr forma parte de los ribosomas, los cuales están formados por dos subunidades llamadas subunidad menor y subunidad mayor (figura 6-2). En el proceso de traducción el ribosoma tiene dos funciones:

- Permitir la unión del ARNm al ARNt, proporcionando los sitios donde interactúan el codón del ARNm con el anticodón del ARNt.
- Catalizar la transferencia del aminoacil-ARNt (ARNt unido a su aminoácido) al peptidil-ARNt (ARNt unido a la cadena peptídica naciente o creciente), siguiendo la secuencia de codones del ARNm, según las equivalencias del código genético.

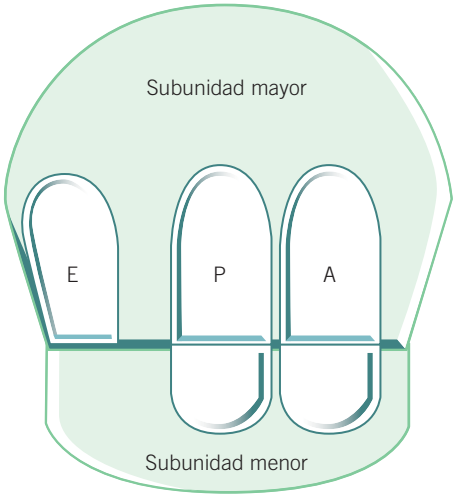


Figura 6-2. Estructura del ribosoma. Complejo molecular formado por dos subunidades (mayor y menor). Es el encargado de sintetizar proteínas a partir de la información contenida en el ARNm.

El ribosoma cuenta con tres sitios llamados A, P y E (figura 1). Los dos primeros sitios se encuentran en ambas subunidades del ARNr y participan directamente en la decodificación del ARNm. El sitio P (centro P o peptidilo) es donde se localiza al peptidil-ARNt y, por lo tanto, donde se observa la elongación de la cadena peptídica, mientras que en el sitio A (centro A o aminoacilo) es el lugar por el cual el aminoacil-ARNt (correspondiente a la lectura del codón) entra al complejo traduccional, para después transferir este aminoácido al peptidil-ARNt y generar el enlace peptídico. El centro catalítico donde se genera este enlace se localiza en la subunidad mayor. En cambio, el sitio E (centro Eliminación o salida) es el lugar por donde saldrá del complejo ribosomal el ARNt sin aminoácido, una vez que lo dejó en la cadena polipeptídica en formación.

Interacción codón/anticodón

La **interacción codón/anticodón** permite al ARNm, dirigir el orden de incorporación de los aminoácidos dentro de la cadena polipeptídica. Estas interacciones ocurren dentro de la subunidad menor.

La interpretación de un codón requiere el principio de complementariedad de bases con el anticodón del aminoacil-ARNt correspondiente. Los tripletes complementarios se aparean no sólo por acoplamiento de AU y de GC, sino que también el ribosoma controla el ambiente, de manera tal que el acoplamiento convencional ocurra en las primeras dos posiciones del codón, pero se permiten reacciones adicionales en la tercera base. En consecuencia, un solo aminoacil-ARNt puede reconocer más de un codón. Además, el apareamiento de interacciones también puede influir en la introducción de bases especiales en ARNt, en especial por modificaciones en el anticodón o cerca de él. La tendencia para que los aminoácidos "similares" sean representados por codones relacionados reduce al mínimo los efectos de mutaciones. Por ejemplo, una mutación de CUC por CUG no tiene ningún efecto, puesto que ambos codones codifican para leucina y una mutación de CUU por AUU reemplaza la leucina por isoleucina, un aminoácido relacionado.

Fenómeno de bamboleo

La interacción codón/anticodón ocurre básicamente con la teoría de complementariedad de base establecida por Watson y Crick, por lo que debería de existir igual número de anticodones que de codones, es decir 61; sin embargo, se sabe que existen menos de 61 ARNt, por lo que se deduce que un ARNt puede complementarse con más de dos codones diferentes.

El reconocimiento se da entre la complementariedad de las bases 1, 2 y 3 del codón con las bases 3, 2 y 1 del anticodón, respectivamente (figura 6-3A). Para explicar este fenómeno se estableció la hipótesis de bamboleo o fluctuación, que expresa dos reglas:

1. Las bases tercera y segunda del anticodón forman puentes de hidrógeno con las bases primera y segunda del codón, lo que determina la especificidad de la interacción codón/anticodón.
2. La primera base del anticodón puede orientarse o girarse de formas ligeramente distintas (bamboleo o fluctuación), para interaccionar con distintas bases en la posición tercera del codón (figura 6-3B). Estas uniones presentan enlaces de hidrógeno diferentes a los observados en las bases tercera y segunda. Debido a esto, la interacción codón/anticodón es más débil.

Dicho de otra manera, esta hipótesis ocurre entre la tercera base del codón y la primera base del anticodón. Las reglas originales del bamboleo sugirieron que el primer nucleótido del anticodón podía complementarse con más de un nucleótido en la tercera posición del codón. Así, los anticodones con un uracilo en la primera posición podían unirse con los codones que tenían adenina o guanina en la tercera posición. Los que presentaban una guanina en la posición 3, podían unirse con los codones que terminaban con uracilo o citosina. Pero algo más interesante se observó cuando el ARNt que presentaba una inosina en la posición 3 podía reconocer los codones que terminaban con citosina, uracilo o adenina. Por ejemplo, el ARNt-Ala de la levadura, anticodón 5'-IGC-3', se puede unir a tres codones: 5-GCC-3', 5'-GCU-3' y 5'-GCA-3'.

Fases de la traducción

La biosíntesis de las proteínas se divide en las siguientes fases o estadios (cuadro 6-3):

- Fase de activación de los aminoácidos.
- Fase de traducción, que comprende:
  - Inicio de la síntesis proteica.

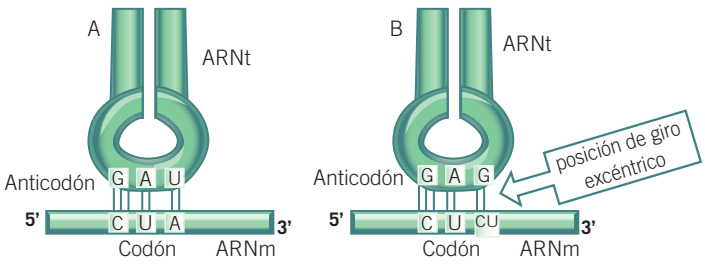


Figura 6-3. Hipótesis de bamboleo. Tres de los 64 posibles codones son reconocidos como codones de terminación de la traducción. Los 61 codones restantes son reconocidos por los ARNt individuales. Por tanto, es posible que un apareamiento de bases que no se dé por complementariedad, ocurra en la posición del tercer codón, esto es, el nucleótido 3' del codón de ARNm y el nucleótido 5' del anticodón de ARNt.

- Elongación de la cadena polipeptídica.
- Terminación de la síntesis de proteínas.

Activación de los aminoácidos

Los aminoácidos son activados mediante la acción de la enzima aminoacil-ARNt-sintetasa y la hidrólisis de dos moléculas de ATP (figura 6-4A), uno para la remoción del pirofosfato (PPi) y el segundo para la hidrólisis de PPi a dos ácidos fosfóricos inorgánicos (2Pi), esta última reacción, con la intervención de la enzima pirofosfatasa, lo que permite que un aminoácido pueda unirse a su ARNt específico, y genera un aminoacil-ARNt cargado (figura 6-4B). En este proceso se libera un AMP + 2Pi y, tras ellos, la enzima, que vuelve a utilizarse. Cada tipo de ARNt, al unirse al aminoácido, lleva antepuesto el nombre del aminoácido que transporta; por ejemplo, leucinil-ARNt para el que transporta leucina, metionil-ARNt para la metionina, y así para todos los aminoácidos. Por otro lado, el ARNt unido al aminoácido compatible con él se designa aminoacil-ARNt^{AA}, en el que "AA" corresponde a la sigla del aminoácido. Por ejemplo, leucinil-ARNt^{Leu}, metionil-ARNt^{Met}, etcétera.

Cuadro 6-3. Estadios y componentes necesarios para la biosíntesis de proteínas.

Estadio	Componentes esenciales
Activación de los aminoácidos	20 aminoácidos 20 aminocil-ARNt sintetasa 32 o más ARNt ATP Mg^{+2}
Iniciación	ARNm N-Formilmetionil-ARNt ARNr subunidad menor ARNr subunidad mayor Factores de Iniciación GTP Mg^{+2}
Elongación	Complejo de Iniciación (complejo ribosomal) aminoacil-ARNt específico para cada codón Factores de elongación GTP Mg^{+2}
Terminación	Codón(es) de paro en el ARNm Factores de liberación

Inicio de la síntesis de proteínas

La fase de iniciación no sólo es el reconocimiento del codón de inicio (codón AUG), sino que también incluye todos los procesos para la formación del complejo traduccional y la formación del primer enlace peptídico (cuadro 6-4). El primer paso que se realiza en el inicio es la unión de la subunidad menor al ARNm (figura 6-5A), con la asistencia de factores de traducción llamados factores de iniciación (IF), como se observa en la tabla 4. Una vez unido el ribosoma al ARNm a través del ARNr, el ARNt iniciador entra al sitio P y reconoce al codón AUG para iniciar la traducción (figura 6-5B). La identificación del sitio P es mediada por la acción de los IF, sólo bajo estas condiciones el ARNt iniciador es el único ARNt que puede entrar por el sitio P; los siguientes entrarán por el sitio A. El ARNt iniciador transportará una metionina que no llevará a un grupo formilo.

La lectura del codón se lee en dirección 5' a 3' por el anticodón, que se unirá en sentido invertido, de 3' a 5'. Ya formada esta unión, la subunidad mayor forma el complejo con la subunidad menor (figura 6-5C), con ayuda de los IF. En el acople de la subunidad menor del ribosoma con el metionil-ARNt, actúa el eIF-4 para eucariotas y el IF-3 para procariotas. IF-2 se asocia con GTP y se unen al metionil-ARNt con el complejo ribosomal, si el codón/anticodón son complementarios, se hidroliza el GTP y la unión se vuelve estable. La iniciación termina cuando el complejo ribosomal está completo y formada la unión codón/anticodón.

En las bacterias esta unión se realiza cerca del codón de inicio en donde una secuencia corta específica del ARNm llamada *secuencia Shine-Dalgarno*, se une por complementariedad a una secuencia en el ARNr de la subunidad menor. Para las células eucariotas la secuencia específica en el ARNm se llama *secuencia Kozak*.

La **secuencia Shine-Dalgarno**, encontrada en procariotas, es rica en purinas, localizada río arriba (extremo 5') a 6 o 10 pares de base del codón de inicio en el ARNm. El ARNr de la subunidad menor cuenta en su extremo 3' con una secuencia que es toda o casi a toda complementaria a la secuencia Shine-Dalgarno, lo que facilita la unión y la colocación del aminoacil-ARNt en la subunidad menor del ribosoma (figura 6-3A).

La **secuencia de Kozak**, encontrada en eucariotas, difiere de la anterior levemente y en ésta se incluye el codón de inicio. La purina a –3 y la guanina a +4 son los determinantes principales. El mecanismo se inicia cuando el ribosoma se une al extremo 5' del ARNm, para posteriormente desplazarse hasta encontrar el codón de inicio situado en la secuencia de Kozak.

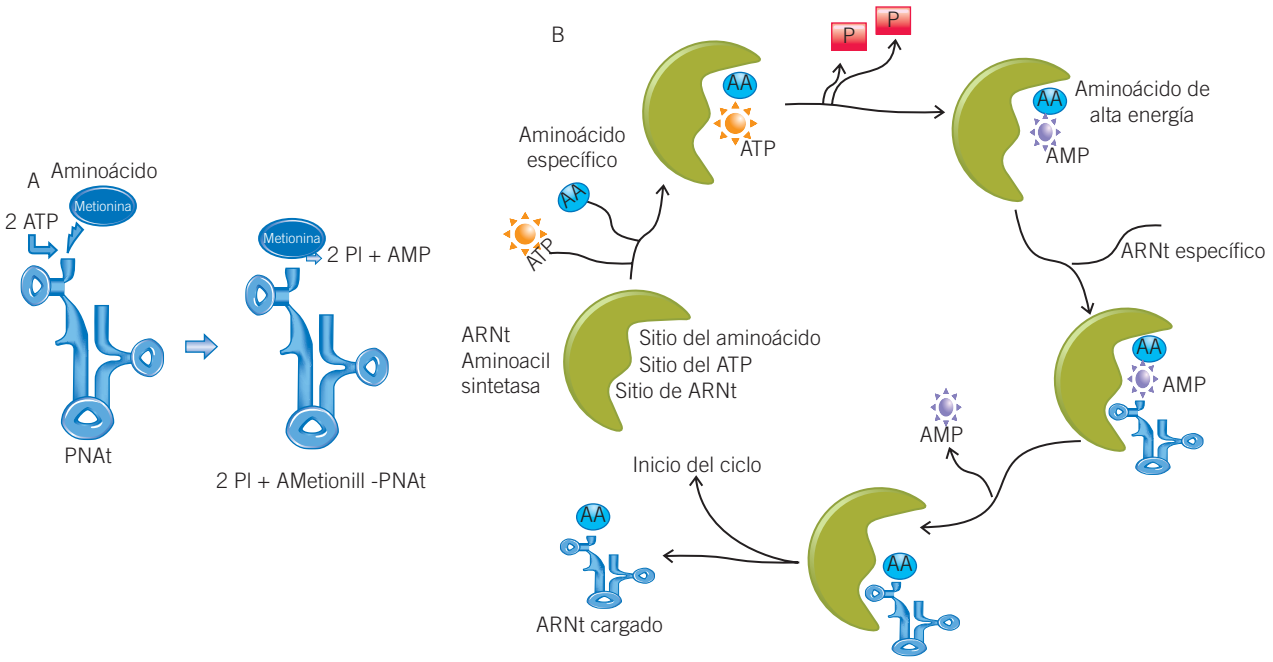


Figura 6-4. Activación de los aminoacil-ARNt. Proceso que requiere de la hidrólisis de ATP en dos reacciones secuenciales, que se catalizan en la enzima, la aminoacil-AENt sintetasa. Primero, la enzima une el aminoácido al fosfato del ATP con la liberación concomitante de pirofosfato. Esto es llamado un intermediario aminoacil-adenilato. En el segundo paso, la enzima cataliza la transferencia del aminoácido a los OH (2' o 3') de la porción de ribosa del residuo de adenosina 3' terminal del ARNt generando un aminoacil-ARNt activado. Aunque esta reacción es libremente reversible, la reacción hacia delante es favorecida por la hidrólisis acoplada del PPi.

Elongación en la síntesis de proteínas

El crecimiento de la cadena polipeptídica implica la incorporación de nuevos aminoácidos, transportados por el aminoacil-ARNt correspondiente y adicionados al extremo carboxi-terminal de la cadena en crecimiento; en otras palabras, el radical carboxilo (–COOH) del aminoácido iniciador se une con el radical amino (NH_2) del aminoácido siguiente mediante la formación de un enlace peptídico (figura 6-6), catalizada por la enzima peptidiltransferasa.

Es una reacción cíclica, que requiere de tres pasos para añadir un aminoácido.

a) Decodificación del aminoacil-ARNt en el sitio A.
b) Transferencia del aminoácido al peptidil-ARNt.
c) Desplazamiento del ribosoma.

Cuadro 6-4. Maquinaria necesaria para llevar a cabo la traducción de una proteína. Diferencias entre procariotas y eucariotas.

	Eucariotas	Procariotas
ARNr	80S	70S
ARNr subunidad pequeña	40S	30S
ARNr subunidad mayor	60S	50S
ARNm	Monocistrónico	Mono y policistrónico
Sitio de reconocimiento del ARNm	Secuencia de Kozak	Secuencia Shine-Dalgarno.
ARNt iniciador	Aminoacilación	Aminoacilación y formilación
Factores de iniciación (IF)	eIF-2,eIF-2B,eIF-3,eIF-4A,eIF-4B,eIF4E y eIF-4G,eIF-5 y eIF-6	IF-1, IF-2, IF-3
Factores de elongación (EF)	eEF-1α, eEF-1βγ y eEF-2	EF-Tu, EF-Ts y EF-G
Factores de terminación (RF)	eRF	RF1, RF2 y RF3

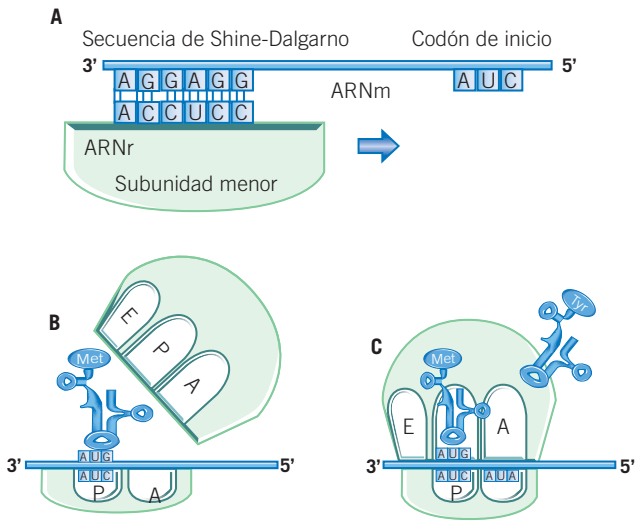


Figura 6-5. Biosíntesis de proteínas (inicio): primera etapa de la biosíntesis proteica. El ARNm se une a la subunidad menor. A éstos se asocia el aminoacil-ARNt, gracias a que el ARNt tiene en un anticodón y el ARNm un codón. Después se une la subunidad ribosómica mayor, formándose el complejo ribosomal. Todos estos procesos están catalizados por los llamados factores de iniciación. El primer codón que se traduce es generalmente el AUG, que corresponde con el aminoácido metionina en eucariotas y formilmetionina en procariotas.

La decodificación requiere forzosamente de dos proteínas de unión al GTP, llamados factores de elongación (EF; cuadro 6-3). Se utiliza una tercera proteína, EF-Tu (en bacterias) y EF-1a (en eucariotas), asociada al aminoacil-ARNt y con un GTP para formar un complejo ternario. Cuando el aminoacil-ARNt se une al codón del ARNm de forma correcta, se genera una hidrólisis que libera un ácido fosfórico del GTP y lo convierte en guanosín difosfato (GDP), lo que permite que la cadena peptídica que contiene el peptidil-ARNt forme un enlace peptídico con el aminoácido que forma parte del aminoacil-ARNt, que se transforma en un nuevo peptidil-ARNt. La enzima que cataliza esta unión es la peptidil-transferasa. Después de esto existe otra hidrólisis de GTP, pero de un complejo originado por la proteína EF-G (en bacterias) o EF-2 (en eucariotas), lo que permite que se realice un desplazamiento del ribosoma (tres nucleótidos hacia el extremo 3' del ARNm, movimiento conocido como *translocación*). Este desplazamiento se da cuando el centro P queda ocupado por un ARNt sin aminoácido, provocando la translocación ribosomal y colocando el ARNt sin aminoácido en el centro E, por donde sale del ribosoma y el peptil-ARNt formado se coloca en el centro P. Se trata de un fenómeno cíclico, por lo que se realizará tantas veces como aminoácidos se añadan a la cadena peptídica en crecimiento.

Terminación de la síntesis de proteínas

La terminación se observa cuando al sitio A lee alguno de los codones de paro o tripletes sin sentido del ARNm, los cuales tienen como característica no codificar para ningún aminoácido. En esta fase, los factores de liberación (RF) imitan al ARNt y reconocen directamente el codón de terminación (cuadro 6-3). Además, estos RF requieren de una

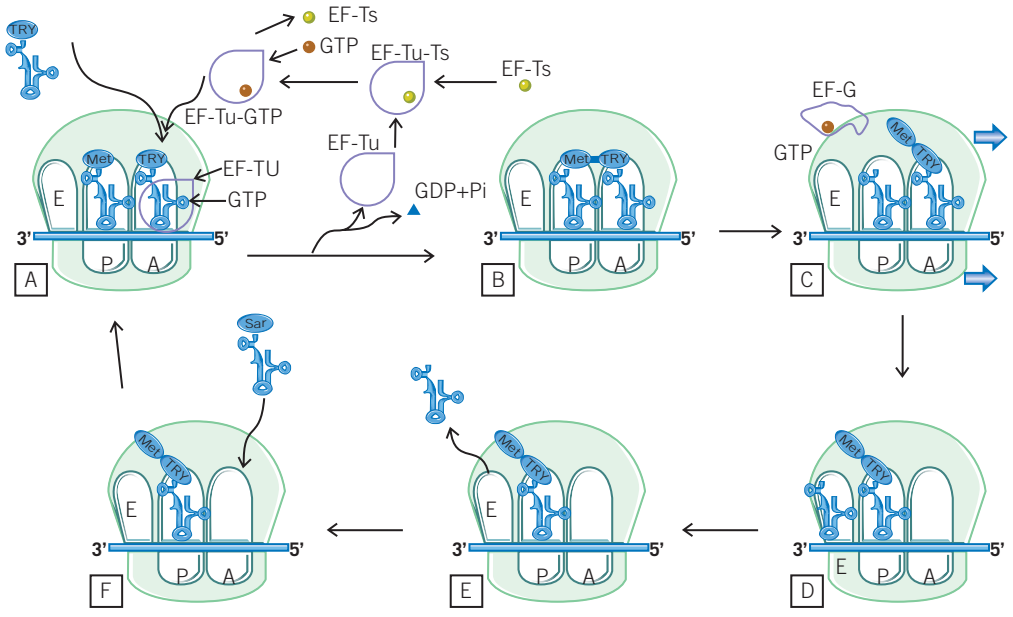


Figura 6-6. Fase de elongación: segunda etapa de la biosíntesis proteica, requiere proteínas específicas llamadas EF. El alargamiento de polipéptidos se produce en forma cíclica, de tal manera que al final de un ciclo completo y la formación de un enlace peptídico, el sitio A estará libre de aminoácidos y se preparará para aceptar el aminoacil-ARNt entrante dictado por el siguiente codón del ARNm.

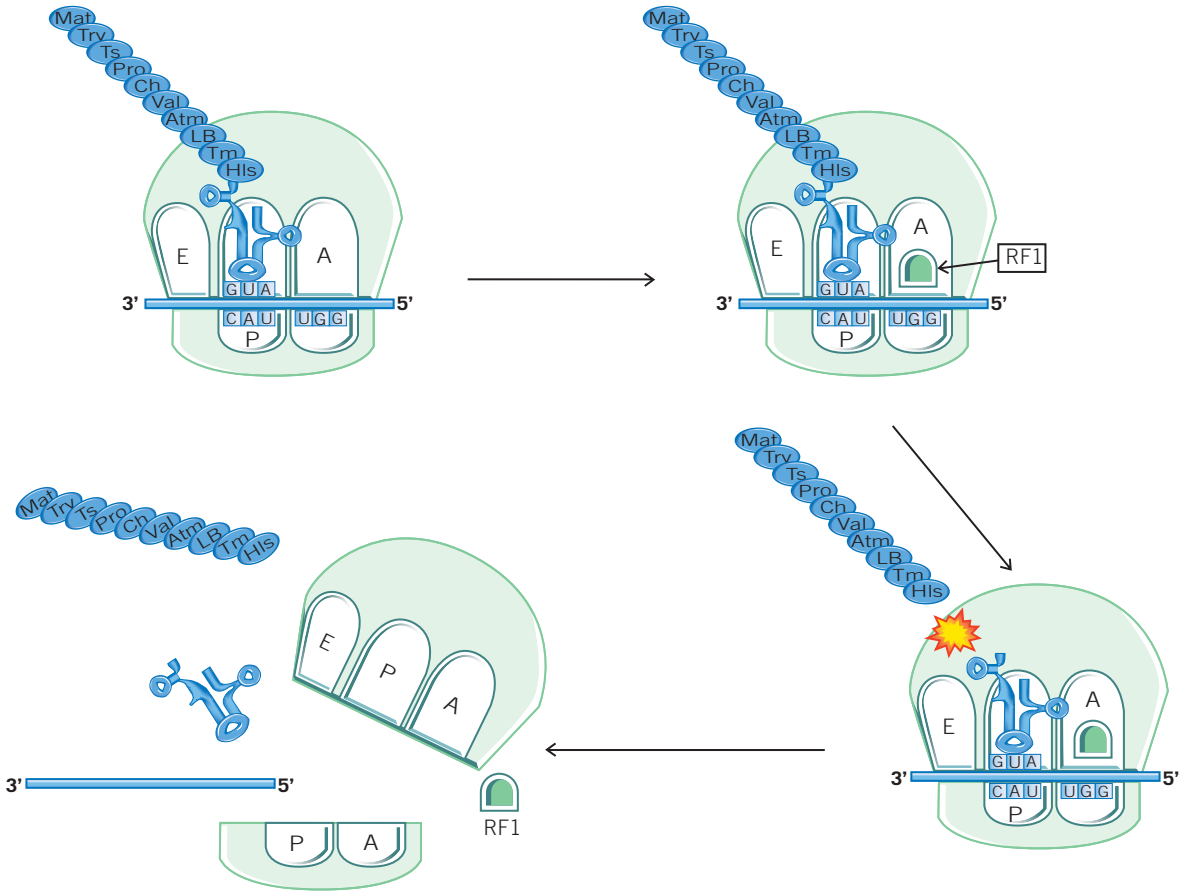


Figura 6-7. Biosíntesis de proteínas (terminación): tercera etapa de la biosíntesis proteica, requiere de factores de terminación (RF). Las señales para la terminación de la síntesis proteica son las mismas tanto en procariotas como en eucariotas. Estas señales son codones de terminación (UAG, UAA y UGA) y se encuentran presentes en el ARNm.

molécula de GTP para permitir que el polipéptido recién sintetizado se libere del complejo traduccional y, al mismo tiempo, permite que se disocie la unión entre el ARNr y el ARNm (figura 6-7).

La terminación de la traducción requiere de dos RF:

a) **Factores clase I,** también llamados factores de liberación específicos de codón (RF-1 y RF-2 para procariotas y eRF-1 para eucariotas).
b) **Factores clase II,** también llamados factores de liberación no específicos (RF-3 en procariotas y eRF-3 en eucariotas) que une un nucleótido de guanina.

Cuando los RF reconocen correctamente el codón de paro, el centro de transferencia o de formación del enlace peptídico dentro del ARNr (llamado dominio V en la subunidad mayor) cambia el modo catalítico e hidroliza al peptidil-ARNt, lo que permite la liberación de la cadena peptídica del ARNt. Ya libre el péptido, el complejo traduccional se disocia por un factor de reciclaje del ribosoma denominado *factor de terminación* (RRF en bacterias), y permite con esto la reutilización del ARNr, de los factores de liberación y del ARNt para la siguiente síntesis proteica.

Una vez finalizada la síntesis de una proteína, el ARNm queda libre y puede leerse de nuevo. De hecho, es muy frecuente que antes de que finalice la síntesis de una proteína ya esté comenzando otra, con lo cual una misma molécula de ARNm está siendo utilizada por varios ribosomas de forma simultánea. Cuando esto se observa, a la estructura que se forma (como un rosario) se le llama **polirribosoma** o **polisoma**.

Tráfico o destino de las proteínas

También llamado topogénesis. Se refiere a la ruta que siguen las proteínas en la célula hasta alcanzar su localización (intra o extracelular) donde ejercerán su función. Esta topogénesis se realiza en el citosol, en donde participan varios organelos (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias, peroxisomas y lisosomas entre los más destacados).

Las proteínas sintetizadas en la célula que son iniciadas por ribosomas libres del citosol como las proteínas nuclea-

Cuadro 6-5. Secuencias típicas de péptido o etiquetas señal. Un péptido señal es una secuencia de aminoácidos que permiten saber hacia dónde debe ser dirigida la proteína o qué función debe cumplir la misma. Muchas proteínas llevan un péptido señal para que sean identificadas y transportadas por el aparato de Golgi hacia el lugar que corresponde

Función del péptido señal	Ejemplo de péptido señal
Importación al RE	-H_3N-Met-Met-Ser-Fen-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gli-Ile-Leu-Fen-Trp-Ala-Tre-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Tre-Lis-Cis-Glu-Val-Fen-Gln
Retención en el lumen del RE	-Lis-Asp--Glu-Leu-COO^-
Importación a la mitocondria	-H3N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Fen-Fen-Lis-Pro-Ala-Tre-Arg-Tre-Leu-Cis-Ser-Ser-Arg-Tir-Leu-Leu
Importación al núcleo	-Pro-Pro-Lis-Lis-Lys-Arg-Lis-Val
Importación a los peroxisomas	-Ser-Lis-Leu-
Unión a la membrana a través de la unión covalente del extremo amino terminal al ácido mirístico.	H_3N,Gli-Ser-Ser-Lis-Ser-Lis-Pro-Lis-

res, las citosólicas y las que están destinadas a cloroplastos, mitocondrias o peroxisomas, concluyen su síntesis en dichos ribosomas para luego dirigirse al citosol. La clave del proceso por el que las proteínas se dirigen a su sitio son las señales de clasificación, conocidas como secuencias señal, péptido señal o etiqueta señal, entre las que se encuentran las proteínas de membrana, lisosomales y de secreción, mientras que las proteínas que no presentan secuencias señal permanecen en el citosol (citosólicas, nucleares, de mitocondria y de peroxisomas).

Péptido señal o etiqueta señal

El péptido señal y la región señal determinan el destino celular correcto de las proteínas. Los péptidos señales cuentan con una secuencia corta de aminoácidos (13-60 aa), situados con frecuencia cerca del extremo amino (N-terminal) de la cadena que marcan a la proteína recién sintetizada (cuadro 6-5). Esta secuencia se divide en tres secciones: la primera cuenta con uno o más aminoácidos básicos en el extremo N-terminal; la segunda se encuentra en la parte central y consta de seis o siete aminoácidos hidrofóbicos, y la tercera se encuentra en la parte C-terminal, es hidrófila y contiene la zona reconocida y cortada por la peptidasa del líder.

Mecanismo de acción. La síntesis de proteínas de secreción se inicia en los ribosomas citosólicos. La secuencia señal sobresale del ribosoma y se une inmediatamente a la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) que se encuentra en el retículo endoplásmico y se interrumpe momentáneamente la síntesis proteica. La SRP se disocia del ribosoma y la síntesis se reinicia. Estos procesos requieren la hidrólisis de un GTP.

En cuanto a su estructura, la SRP es una ribonucleoproteína formada por seis polipéptidos y un ARN, del grupo de los ARN citoplasmáticos pequeños o scARN.

La proteína TRAM (translocación a través de la membrana) se une a la secuencia señal y, junto con una familia de moléculas llamadas proteínas Sec (SecA, SecY y SecE), forman el complejo de translocación, que dirige la proteína naciente hacia el interior del retículo endoplásmico. La secuencia señal a menudo es eliminada de la proteína por escisión proteolítica de la peptidasa en el interior del retículo endoplásmico. Una vez completa la síntesis, el ribosoma se disocia de la membrana del retículo endoplásmico y puede volver a comenzar un nuevo ciclo.

Algunas proteínas pueden atravesar la membrana del retículo endoplásmico después de su síntesis. En este caso, se necesita la intervención de una o más proteínas desnaturalizantes que aprovechan la energía de la hidrólisis del ATP para mantener la proteína total o parcialmente desnaturalizada mientras atraviesa la membrana.

El aspecto más destacable del tráfico intracelular es el que corresponde a las proteínas de secreción. Esto ocurre a través de la membrana del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

Modificaciones postraduccionales

La expresión de los genes en todos los organismos procariotas y eucariotas, está controlada por una gran variedad de mecanismos (cuadro 6-4). La mayoría de los procesos biológicos son regulados por modificaciones postraduccionales de las proteínas, y las condiciones que interrumpen la regulación de tales acontecimientos pueden conducir al desarrollo de una enfermedad.

Diversos aminoácidos que forman la cadena polipeptídica sufren modificaciones químicas en sitios específicos, que pueden afectar la estructura o la función de la proteína. Estas modificaciones se correlacionan con la estabilidad y la capacidad de presentar giros en la proteína y, en un grado menor, en la función.

Muchas cadenas polipeptídicas se modifican mientras están unidas al complejo ribosomal o cuando finaliza su síntesis. Como las modificaciones se realizan ya iniciada la traducción se denominan modificaciones postraduccionales. Tras la traducción hay proteínas enzimáticas que ya son activas y otras que precisan ser modificadas. En estas modi-

ficaciones participan remociones de aminoácidos (generalmente se separa el aminoácido metionina o aminoácido iniciador); la adición de uno o varios grupos químicos, y la asociación de iones o coenzimas (grupo prostético) en algunas enzimas. Todas estas modificaciones son necesarias para darle actividad a la proteína.

Las proteínas pueden estar constituidas por una cadena polipeptídica o por varias subunidades, y estas últimas pueden ser iguales o distintas, según provengan del mismo gen o de genes diferentes. El control de calidad del plegamiento de las proteínas para adquirir la estructura cuaternaria o conformación tridimensional se lleva a cabo por chaperonas y proteasas. Las proteínas chaperonas tienen la función de plegar o replegar de forma correcta las proteínas recién sintetizadas (modificación postraduccional), y las proteasas deben degradar aquellas proteínas que, a pesar de la acción de las chaperonas, no se pliegan de forma correcta.

Las modificaciones postraduccionales son importantes para determinar la función y la actividad de la proteína. De las casi 200 modificaciones distintas que se conocen, la fosforilación es una de las modificaciones más importantes y abundantes, con más del 30% de proteínas modificadas por este proceso. Tales modificaciones tienen un papel importante en la estabilidad, plegamiento y reconocimiento. Las proteínas glucosiladas pueden ser encontradas en los compartimientos intracelulares.

Los principales mecanismos de modificaciones postraduccionales son los producidos en la etiqueta señal, en algunos residuos de aminoácidos (glucosilación, fosforilación, hidroxilación, acetilación, etcétera) y la proteólisis.

Dentro de las modificaciones covalentes, se encuentran las modificaciones a grupos funcionales (R) y cadenas laterales amino y carboxiloterminales. Para el grupo R se han encontrado más de 150 modificaciones covalentes diferentes. Estas modificaciones se conocen para los siguientes aminoácidos: Ala, Gli, Ile, Leu, Met y Val. Las modificaciones postraduccionales más importantes son:

Acetilación

Muchas proteínas están modificadas en su N-terminal. En la mayoría de los casos, la metionina (iniciador) es hidroxilada y un grupo acetilo se agrega al nuevo aminoácido N-terminal; se observa hasta en un 50% en proteínas de eucariotas. Uno de los efectos que presentan esta modificación es el incremento de la resistencia a su degradación. También se observa una acetilación en la lisina de la histona H4 de manera reversible, que le hace responsable de la regulación de la condensación de la cromatina.

El Acetil-CoA es el donador del acetilo para estas reacciones. Algunas proteínas tienen el grupo de miristoil de 14 carbonos agregado a su N-terminal. El donador para esta modificación es el miristoil-CoA. Esta última modificación permite la asociación de la proteína modificada con las membranas. La subunidad catalítica de la proteincinasa dependiente del cAMP (PKA) se encuentra miristoilado.

Carboxilación

En los aminoácidos de algunas proteínas, se añade un grupo carboxilo a la cadena lateral de un aminoácido, como en el $-CH^{+2}$ del aspartato (β-carboxiaspartato), o del glutamato (γ-carboxiglutamato). Este último es esencial para la trombina como factor de coagulación por su acción quelante hacia el Ca^{+2}. También participan en proteínas estructurales del hueso. La carencia de vitamina K, que participa como cofactor en la carboxilación del ácido glutámico, permite que se carboxile de manera insuficiente durante la biosíntesis de aminoácidos, y ocasiona la generación del síndrome hemorrágico.

Metilación

La metilación postraduccional de las proteínas ocurre en los nitrógenos y en los oxígenos; el donador de grupos metilo activado es la S-adenosilmetionina (SAM). Las metilaciones más comunes están en la ε-amina de los residuos de lisina, y algunas metilaciones de nitrógeno adicionales se encuentran en el anillo imidasólico de la histidina, en el grupo guanino de la arginina y en los grupos R del glutamato y del aspartato. La N metilación es una modificación permanente y no se conocen enzimas en los mamíferos que puedan eliminar el grupo metilo. La metilación del oxígeno de los grupos R del glutamato y del aspartato también puede formar ésteres metilados. Las proteínas también pueden metilarse en los grupos R-tioles de la cisteína. La metilación de las histonas en el ADN es un regulador importante de la estructura de la cromatina y en consecuencia de la actividad transcripcional. Esta regulación se da en el Lis-20 de las H4, en proteínas musculares y en el citocromo C; estos dos últimos contienen monometil y dimetil-lisina.

Fosforilación

La fosforilación postraduccional es una de las modificaciones de la proteína más comunes que ocurren en las células animales y actúa casi siempre de forma reversible (fosforilación y desfosforilación). La gran mayoría de fosforilaciones ocurren como un mecanismo para regular la actividad biológica de una proteína (regulación por modificación covalente). En otros términos, un fosfato (o más de uno en muchos casos) se agrega y después se quita.

Fisiológicamente, los ejemplos pertinentes son que las fosforilaciones que ocurren en la síntesis de glucógeno y fosforilación del glucógeno en los hepatocitos, en respuesta al glucagon que libera el páncreas. Las fosforilaciones que ocurren en la síntesis inhiben su actividad, considerando que la actividad de la fosforilasa se aumenta.

La versatilidad de la fosforilación de los grupos fosfato es un interruptor que, según donde ocurra, provoca el encendido o el apagado del proceso de división celular. El proceso de fosforilación también permite entender por qué una pequeña mutación en el material genético, que da lugar a un cambio de un aminoácido por otro en una proteína

participante en la división celular, puede hacer que las células proliferen continuamente, al perderse el sitio en el que se introduce un grupo fosfato para bloquear su actividad.

Las proteínas que provocan la fosforilación son las cinasas y las que eliminan los fosfatos son las fosfatasas. Las cinasas catalizan la siguiente reacción:

$$\text{ATP} + \text{proteína} \longleftrightarrow \text{fosfoproteína} + \text{ADP}$$

En células animales, la serina, la treonina y la tirosina están sujetas a la fosforilación, que afecta a su grupo –OH. Aunque el nivel de fosforilación de la tirosina es menor, su fosforilación es funcionalmente muy importante. Como un ejemplo, la actividad de numerosos receptores del factor de crecimiento es controlada por la fosforilación de la tirosina.

Sulfatación

La modificación del sulfato en algunas proteínas ocurre en los residuos de tirosina, como se observa en el fibrinógeno y en algunas proteínas secretoras. El donador del sulfato universal es el 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato (PAPS). Puesto que el sulfato es agregado de forma permanente, es necesario para la actividad biológica y no se utiliza como una modificación regulatoria, como sucede en la fosforilación de tirosina.

Glicosilación o glucosilación

Una de las formas más comunes de modificación proteica está representada por la glucosilación. Se le da este nombre debido a que se unen de manera covalente las cadenas de oligosacáridos (glicanos), con algunos aminoácidos de la cadena proteica y en general no desempeña un papel en la regulación de la actividad de la proteína. Sin embargo, debido al fenómeno hidrofílico de los azúcares, mantienen la solubilidad de las glicoproteínas y aseguran el plegamiento correcto de los dominios, por lo que dan la estabilidad extracelular de la proteína contra la degradación. Esta modificación es frecuente en proteínas de membrana, y casi no se observan en proteínas intracelulares; se observa en eucariotas y virus, pero no en procariotas.

Hidroxilación

La función de un gran número de hidroxilasas, presentes en el RE, es la de catalizar la incorporación de grupos –OH a algunas proteínas. Estas modificaciones que dependen de la vitamina C como cofactor incluyen hidroxilaciones de prolina, lisina (se observa en 50% de las prolinas presentes en colágeno) y la amidación del C-terminal. Las enzimas que se hidroxilan se identifican como prolil hidroxilasa y lisil hidroxilasa. El donante de la amida para la amidación del C-terminal es la glicina. Las proteínas hidroxiladas más importantes son los colágenos. Varias hormonas peptídicas, como la oxitocina y la vasopresina, tienen amidación el C-terminal. Debido a lo anterior, una mala hidroxilación del colágeno podría derivar en el desarrollo de escorbuto, acompañado con déficit de vitamina C.

Modificación con lípidos

Acilación

En general, esta reacción tiene lugar en proteínas citosólicas insolubles, sintetizadas en ribosomas libres. Afecta las cadenas laterales y/o los extremos del polipéptido, incrementando su hidrofobicidad y proporcionando a la proteína un punto de anclaje en la membrana. Los principales ácidos grasos que se incorporan por acilación son: el miristato (14C), el palmitato (16C) y el estearato u oleato (18C), en las cadenas laterales de serina y treonina, formando un enlace éster con el grupo –OH, y en cisteína formando enlace tioéster con el SH.

Prenilación (terpenos)

Se refiere a la adición del grupo geranilo (10C) farnesil (15C) o el geranilgeranilo (20C) a proteínas receptoras, que son compuestos isoprenoides derivados, los dos primeros, de la vía biosintética del colesterol. Los grupos isoprenoides se unen a residuos de cisteína en el extremo C-terminal de las proteínas, con la formación de un enlace tioéter (C-S-C). Se ha identificado una secuencia consenso común en el extremo C-terminal de las proteínas preniladas y se compone de CAAX, donde C es cisteína, A es cualquier aminoácido alifático (excepto alanina) y X es el aminoácido C-terminal. Para que la reacción de prenilación ocurra, los tres aminoácidos C-terminal (AAX) son retirados. Después de unirse el grupo prenilado, el carboxilato de la cisteína se metila en una reacción que utiliza S-adenosilmetionina como donante de metilenos.

Algunas de las proteínas más importantes, cuyas funciones dependen de la prenilación, son aquellas que modulan la respuesta inmune. Estas proteínas incluyen las involucradas en la motilidad, la activación y la proliferación de los leucocitos y en las funciones inmunes de las células endoteliales. Otras de las proteínas modificadas con farnesilo son la proteína ligadora e hidrolizante de GTP, llamada RAS, y las proteínas-G, que se unen e hidrolizan el GTP en las cascadas de señalización intracelular. Estas funciones modifican la respuesta inmune de muchas proteínas preniladas, que son la base de las acciones antiinflamatorias de los fármacos que inhiben las síntesis de colesterol, llamadas estatinas, debido a que disminuyen la síntesis de farnesil pirofosfato y geranil pirofosfato y, por tanto, reducen los episodios inflamatorios.

Formación de puentes disulfuro

Los enlaces de disulfuro se forman generalmente en el lumen del RER, pero no en el citosol, por la enzima proteína-disulfuro isomerasa. Esto se debe al ambiente oxidante

Cuadro 6-6. Efecto inhibidor en células eucariotas. Inhiben la síntesis proteica en organismos eucariotas. Actúan interfiriendo la actividad del peptidiltransferasa al bloquear la elongación.

Molécula	Etapa	Descripción
Pactamicina	Iniciación	Evita la unión del Met-ARNt con la ARNr subunidad menor
Showdomicina	Iniciación	Impide la creación del complejo Met-ARNt
Interferón	Iniciación	Inactiva al eE2 mediante una fosforilación
Tetraciclinas	Elongación	Impide la unión del aa-ARNt al nivel del sitio A del ARNr
Ricina	Elongación	Se une al ARNr subunidad mayor impidiendo la formación del complejo aa-ARNt: eEF-1a:GTP y posiblemente también al eEF-2
Ciclohexamida	Elongación	Inhibe a la enzima peptidiltransferasa
Puromicina	Elongación	Forma una unión con el péptido creciente provocando una finalización temprana. Es un análogo del aa-ARNt
Esparsomocina	Elongación	Inhibe la translocación
Ácido fusídico	Elongación	Evita la liberación del EF-G, uniéndose al complejo EF-G:GDP e inhibe al eEF-2
Toxina diftérica	Elongación	Inactiva al EF-2 de manera irreversible

del retículo endoplásmico y al ambiente reductor del citosol. Así, los enlaces de disulfuro se encuentran, sobre todo, en proteínas secretoras, lisosomales, y en los dominios exoplasmáticos de las proteínas de la membrana. Hay excepciones notables a esta regla. Un número de proteínas citosólicas tienen residuos de cisteína próximos uno contra el otro, que funcionan como los sensores de la oxidación; cuando el potencial reductor de la célula falla, oxidan y accionan mecanismos celulares de respuesta. Varias proteínas forman enlaces covalentes mediante puentes disulfuro entre la cisteína de la misma cadena (intracatenaria) o con otra de una cadena distinta (intercatenaria). Este tipo de enlaces se dan en menor cantidad en las proteínas intracelulares que en las extracelulares, favorecen un correcto plegamiento y ayudan a la protección de la conformación nativa de la proteína de la desnaturalización.

Procesamiento proteolítico

También llamada por algunos científicos recorte, es el mecanismo más común de modificaciones, aunque también se presenta la derivación de aminoácidos específicos. Probablemente la gran mayoría de las proteínas maduras deben modificarse de esta manera: a todas se les deben retirar algunas porciones de la cadena [metionina (o-Met)], después de emerger del ribosoma. Muchas proteínas involucradas en una gama de procesos biológicos se sintetizan como precursores inactivos, que se activan en condiciones adecuadas mediante la proteólisis limitada.

Precursores inactivos → Proteólisis limitada → Proteína funcional

Por ejemplo:

Tripsinógeno → Tripsina

Quimiotripsinógeno → Quimiotripsina

Proinsulina (84 residuos) → Propéptido (corte de 33 residuos) → Insulina

En todos los casos, las flechas significan corte proteolítico.

A las proteínas inactivas, activadas al retirarles segmentos de la cadena, se las denomina proproteínas, y a los segmentos extraídos, propéptidos.

Inhibidores de la síntesis de proteínas

En la actualidad, un sinnúmero de moléculas actúan deteniendo, complicando o evitando la síntesis de una nueva proteína (cuadros 6-6 y 6-7). Esta característica de algunas moléculas se utiliza en el ámbito farmacéutico, donde se observa que las principales moléculas inhibidoras de la síntesis de proteínas son los antibióticos. Más de la mitad de los antibióticos actúan inhibiendo uno de organelos responsables de la síntesis de proteínas, el complejo ribosomal. Su mecanismo se ve favorecido por la capacidad de diferenciar entre los procesos de traducción presentes en procariotas y eucariotas, y así inhibe de forma selectiva la síntesis de proteínas en las bacterias sin afectar al huésped.

Los antibióticos pueden agruparse según la fase concreta de la elongación sobre la que actúan en:

a) Inhibición del reconocimiento de un aminoacil-ARNt en el sitio A del ribosoma.
b) Inducción de la presencia de errores en la lectura del ARNm.
c) Inhibición de la formación del enlace peptídico.
d) Inhibición de la translocación del peptidil-ARNt desde el sitio A al sitio P.
e) Bloqueo de los factores de elongación.

Cuadro 6-7. Efecto inhibidor en células procariotas. Inhiben la formación del complejo traduccional principalmente uniéndose a uno de los dos ribosomas (mayor o menor)

Molécula	Etapa	Descripción
Mupirocina	Activación de los aminoácidos	Impide la unión de Ile, Inhibiendo de manera competitiva a la enzima Ile-ARNt sintetasa.
Estreptomicina	Iniciación	Se une al ARNr subunidad menor de manera irreversible, modificando la entrada del fMet-ARNt y puede provocar errores de lectura en el ARNm.
Eritromicina	Iniciación	Impide la formación del complejo ribosomal (la unión del ARNr subunidad menor con el ARNr subunidad mayor) fijándose en el ARNr subunidad mayor.
Tetraciclinas	Elongación	Impide la unión del aa-ARNt al nivel del sitio A del ARNr
Kirromicina	Elongación	Evita la separación del EF-Tu del GDP impidiendo la salida del ribosoma
Cloranfenicol	Elongación	Impide la unión del aa-ARNt con la enzima peptidiltransferasa.
Puromicina	Elongación	Forma una unión con el péptido creciente provocando una finalización temprana. Es un análogo del aa-ARNt.
Aminoglucósidos distintos a la estreptomicina	Elongación	Impiden la unión del EF-G al ARNr subunidad mayor.
Ácido fusídico	Elongación	Evita la liberación del EF-G, uniéndose al complejo EF-G:GDP e inhibe al eEF-2.

Nota: Las tetraciclinas, la puromicina y el ácido fusídico actúan tanto en células procariotas como en eucariotas. Actualmente no se conoce alguna molécula que actúe a nivel de la terminación de la traducción.

Inhibición del reconocimiento de un aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma

Tetraciclinas: interactúan con las subunidades ribosomales pequeñas y no permiten la entrada al aminoacil-ARNt al complejo ribosomal, evitando su unión al complejo ARNm-ribosoma. *In vitro* actúan tanto en ribosomas 70S como en 80S, pero *in vivo* no se observa este fenómeno. Esto se debe a que las bacterias transportan complejos de tetraciclina-Mg de forma "suicida", cosa que no ocurre en eucariotas.

Inductores de errores en la lectura del ARNm

Aminoglucósidos: principalmente la **estreptomicina**, que en concentraciones relativamente bajas se une a los polirribosomas que están traduciendo el ARNm, provocando errores en la lectura del ARNm, al distorsionar la estructura del ribosoma. Por lo tanto, la bacteria comienza a sintetizar proteínas defectuosas, con un efecto final bactericida. En concentraciones mayores, se une a la subunidad 30S, modificando su estructura, lo que hace que el inicio no se produzca. Otros aminoglucósidos, como la **gentamicina**, las **amicacinas**, la **tobramicina** y la **kanamicina**, evitan la asociación ribosómica al final de la fase de iniciación y provocan una mala lectura del código genético.

Neomicina y **eritromicina**: se unen a la subunidad 50S bloqueando la translocación del complejo ribosomal.

Inhibición de la formación del enlace peptídico

Puromicina: en su estructura es similar al aminoacil-ARNt de la tirosina, por lo cual se puede unir, en el sitio A, a la cadena peptídica creciente, mediante la formación de un enlace peptídico, formando un peptidil-puromicina. Esta acción permite bloquear la translocación del complejo ribosomal, produciendo que se desacople rápidamente este complejo, evitando la elongación y causando una terminación prematura de la síntesis del péptido creciente en células tanto procariotas como eucariotas.

Inhibición de la translocación del peptidil-ARNt desde el sitio A al sitio P

Macrólidos y **lincosamidas**: se unen a la subunidad ribosomal 70S inhibiendo la reacción de la peptidil transferasa. Bloquean el paso de translocación e interfieren específicamente con la liberación del ARNt desacilado; es decir, impiden que el ARNt "recién ingresado", salga del complejo una vez que ha cumplido su misión al transferirse el aminoácido al péptido naciente. Es decir, el peptidil-ARNt cargado y situado en el sitio A, no puede translocarse al sitio P, lo que detiene la síntesis de proteínas.

Bloqueo de los factores de elongación

Cloranfenicol: inhibe a la enzima peptidil transferasa en procariotas, y bloquea la fase de la transferencia peptídica de la elongación en la subunidad ribosómica 50S, y cuando su concentración se incrementa puede inhibir la síntesis de proteínas mitocondriales.

En los cuadros 6-6 y 6-7 se enlistan algunas de las moléculas con acción sobre la traducción, tanto en células eucariotas como en procariotas.

Bibliografía

Apweiler R., Bairoch A., Wu CH., Barker W.C., Boeckmann B., Ferro S., *et al*. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*, 2004;32:D115-D119.

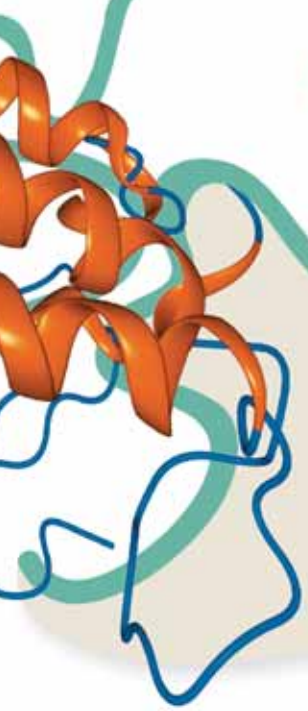
Creighton T.E. *Encyclopedia of Molecular Biology*. European Molecular Biology Laboratory. Londres: 1999 1-4:4595.

González Flecha F.L., Castello P.R., Gagliardino J.J., Rossi J.P.F.C. La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al Día Internacional*, 2000;3(2):1-17.

Nalivaeva N.N., Turner A.J. *Post-translational modifications of proteins: Acetylcholinesterase as a model system*. Proteomics, 2001;1:735–747.

Schweppe R.E., Haydon C.E., Lewis T.S., Resing K.A., Ahn N.G. The characterization of protein post-translational modifications by mass spectrometry. *Acc Chem Res*, 2003;36(6):453-461.

Xu Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ*, 2003;10(4):400–403.



Capítulo 7

Regulación de la expresión génica

Adriana María Salazar Montes / Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Juan Armendáriz Borunda

Introducción

La información genética de una célula está contenida en su ADN, el cual contiene la información necesaria para crear miles de moléculas diferentes y, con ello, conformar un individuo completo.

Un organismo procariótico, como una bacteria, consta de millones de nucleótidos, en tanto que uno eucariótico, como el ser humano, de varios billones. A pesar de contener toda esa información, la célula sólo expresa una fracción de sus genes, lo que le otorga un fenotipo característico. Así, cada uno de los 10 000 tipos de células que constituyen los organismos multicelulares expresan genes diferentes.

Aunque los diversos tipos de células en un organismo multicelular contienen la misma información genética, su estructura y función difieren ampliamente. Una neurona y un linfocito, por ejemplo, son muy diferentes, por lo que es difícil pensar que estas dos células contienen el mismo genoma como sucede en realidad. Por esta razón, se creía que los genes se perdían cuando las células se diferenciaban. Ahora se sabe que las células de un organismo multicelular son distintas porque sintetizan diferentes ARN mensajeros (ARNm) y, por ende, diferentes proteínas a partir del mismo genoma.

Regulación de la expresión génica

Uno de los principios fundamentales de la biología celular es que la actividad y las propiedades de cada célula están determinadas por las proteínas que contienen. Pero, ¿qué determina los tipos y la cantidad de proteínas que se encuentran en una célula? ¿Qué determina la frecuencia con que se traducen los ARNm y la estabilidad de las proteínas?

El término *expresión génica* se refiere al proceso mediante el cual la información codificada en un gen se transcribe en uno o varios ARN funcionales. La expresión de un gen se inicia con el proceso de transcripción controlado por proteínas denominadas *factores transcripcionales*, regulados por señales recibidas por las células, y concluye con la producción de un ARN funcional y, posteriormente, en el caso de los ARNm, con la traducción de una proteína madura y activa. Los factores transcripcionales son proteínas de unión al ADN que reconocen una secuencia específica y se requieren para el encendido y apagado de los genes. La expresión de un gen se regula en diferentes niveles, desde su inicio hasta su terminación.

Niveles de control de la expresión génica

Los niveles del control de la expresión de un gen son los siguientes:

1. Pretranscripción.
2. Transcripción.
3. Procesamiento del tránscrito primario de ARN.
4. Transporte del ARNm al citoplasma.
5. Traducción del ARNm.
6. Degradación del ARNm.
7. Modificaciones postraduccionales.

Nivel pretranscripcional

La estructura de los genes cambia cuando van a ser transcritos; un cambio conformacional en la cromatina es el primer paso en la expresión génica. En el núcleo de una célula eucariota, el ADN se encuentra enrollado alrededor de octámeros de histonas para formar los nucleosomas, lo que impide la transcripción de los genes; es necesario que el ADN se desenrrolle y se separe de las histonas para que pueda llevarse a cabo la transcripción. Cada una de las histonas que forman el nucleosoma tiene, en su extremo aminoterminal, una cola que se extiende por fuera de la doble hélice de ADN (figura 7-1). Se dispone de pruebas de que la

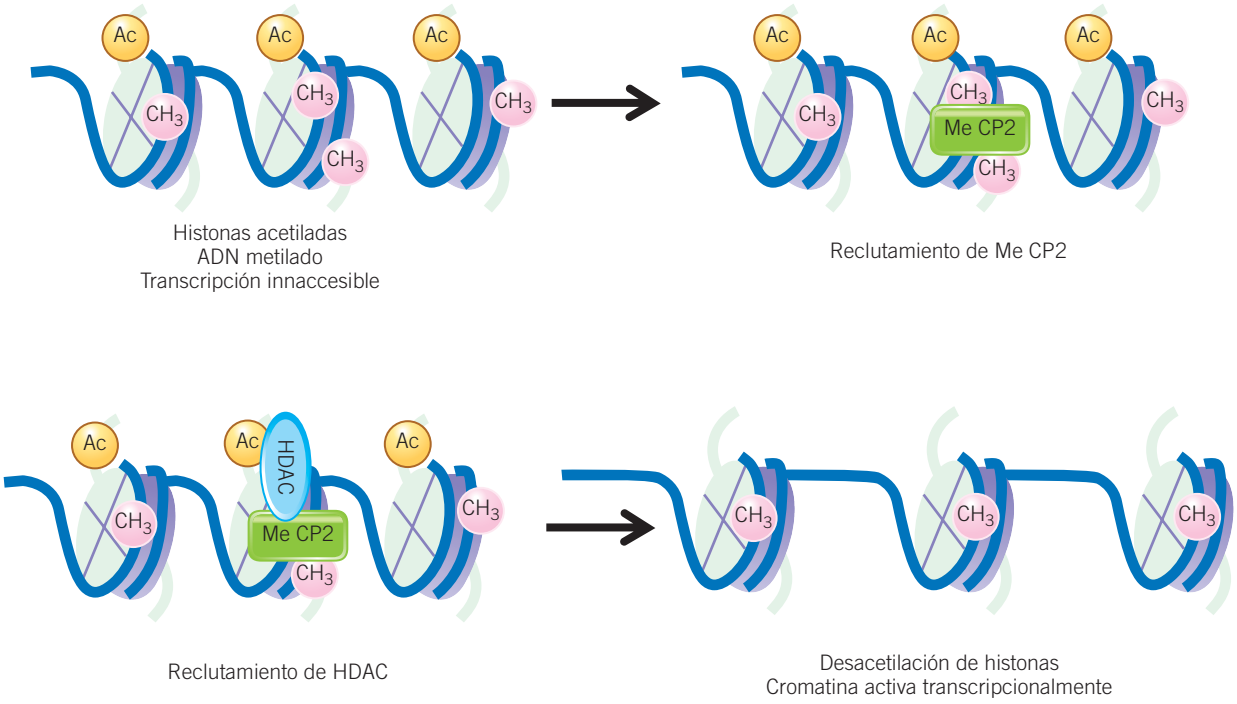


Figura 7-1. Control pretranscripcional de la expresión génica.

metilación de la histona H3 promueve la compactación de la cromatina e inhibe la transcripción. Por otra parte, la acetilación de residuos de lisina en las histonas tiene un efecto opuesto, es decir, esta acetilación evita que las fibras de cromatina se plieguen dejando expuestos segmentos de ADN, para ser reconocidos por factores transcripcionales, y se forme el complejo basal de la transcripción. Las enzimas encargadas de agregar residuos de acetilo a las lisinas en las histonas se denominan *acetiltransferasas*. La unión de un factor transcripcional al ADN recluta a una proteína, llamada *coactivador*, a la región de la cromatina destinada a la transcripción. El coactivador acetila, entonces, a las histonas de los nucleosomas, que pierden su carga positiva, liberan el ADN del nucleosoma y dejan libre el promotor, lo que permite la unión de más factores transcripcionales, ensamblándose la maquinaria de transcripción y dando inicio a este proceso (figura 7-1B).

Nivel transcripcional

En el control de la expresión de un gen a nivel transcripcional intervienen elementos CIS y TRANS. Los elementos CIS están constituidos por las secuencias en el ADN (promotor, *enhacer*, *silencer*) en donde se unen diversas proteínas, entre ellas los factores transcripcionales. Los elementos TRANS son, precisamente, los factores transcripcionales unidos al ADN en su secuencia blanco y que desempeñan un papel fundamental en este control. Estas proteínas se identificaron por primera vez en 1950 y están presentes tanto en células eucariotas como en procariotas. Su desempeño en una célula procariota es muy sencillo y en una eucariota, mucho más complejo.

Los factores transcripcionales se unen al ADN en el surco mayor, ya que la conformación de la proteína es complementaria a la superficie espacial de la doble hélice; la proteína interactúa con el ADN a través de enlaces, como puentes de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas que, aunque son enlaces débiles, la gran cantidad permite lograr una unión fuerte y altamente específica (figura 7-2).

Control transcripcional en procariotes

La expresión de los genes de los organismos procariotes, como las bacterias, está determinada por las condiciones ambientales en las que se encuentran la disponibilidad de alimento como uno de los factores más importantes.

En las bacterias, la mayoría de los genes relacionados con el metabolismo están agrupados en operones. Los genes pertenecientes al mismo operón se prenden y se apagan al mismo tiempo. Un operón se define como un fragmento de ADN que contiene los genes de las proteínas que participan en la misma vía metabólica. El operón más conocido y más estudiado es el operón Lac de *Escherichia coli* y es uno de los ejemplos clásicos de regulación génica. Este operón se encarga de metabolizar la lactosa para obtener energía. En ausencia de lactosa en el medio, los genes del operón Lac se encuentran apagados, puesto que la bacteria está obteniendo energía de otras fuentes. Sin embargo, cuando la bacteria está expuesta a un medio rico en lactosa, la expresión del

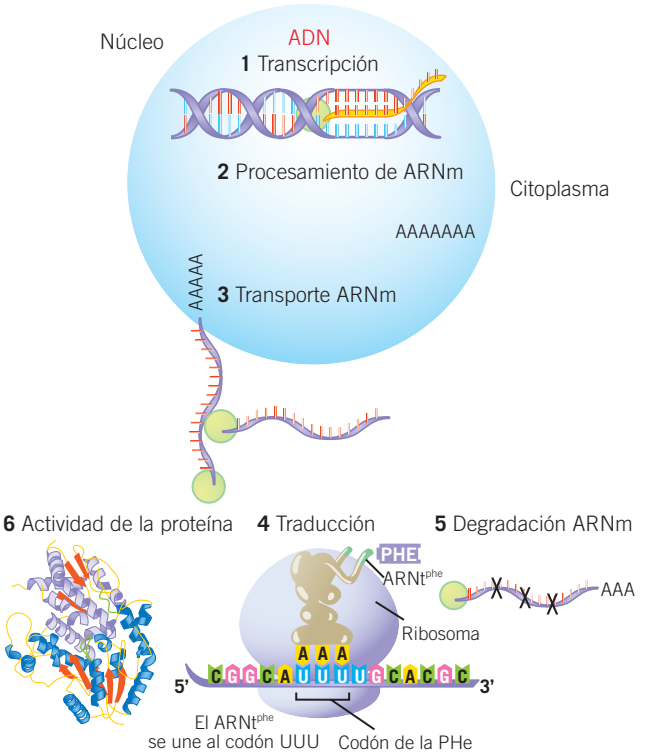


Figura 7-2. Niveles de regulación de la transcripción.

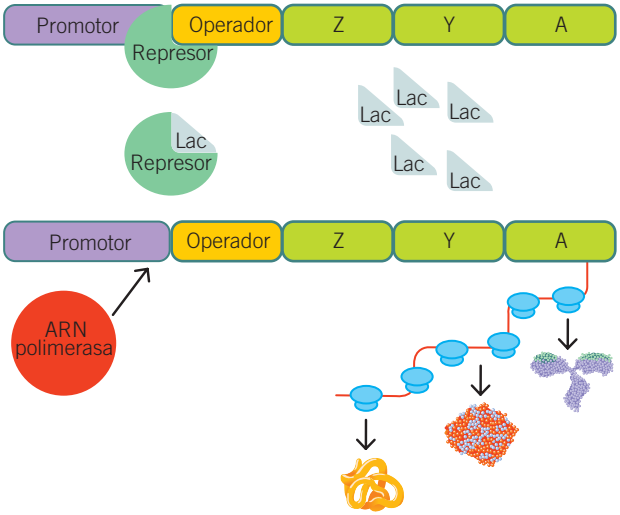


Figura 7-3. Operón Lac.

operón Lac se activa. Este operón contiene tres genes, *Z*, *Y* y *A* (figura 7-3). El gen *Y* codifica para una permeasa de lactosa que introduce a la lactosa en la célula; el gen *Z* codifica para la β-galactosidasa, una enzima que rompe el enlace glicosídico de la lactosa y libera los dos monosacáridos que la constituyen (glucosa y galactosa), y el gen *A* codifica para la enzima tiogalactósido transacetilasa, que elimina de la célula los tiogalactósidos transportados a la célula junto con la lactosa.

En el funcionamiento normal del operón Lac, existe una proteína llamada *represor* (un factor transcripcional) que inhibe su expresión. En ausencia de lactosa, este represor permanece unido al promotor del operón. En presencia de lactosa en el medio, ésta se une al represor y provoca en él un cambio conformacional e impide que se una al ADN. Esto permite la transcripción del operón Lac y, con ello, la expresión de los tres genes que actúan en el metabolismo de la lactosa (figura 7-3).

Control transcripcional en eucariotes

La transcripción de los genes la controla el promotor (véase el capítulo 5). Algunos promotores son sencillos y están regidos por una sola señal que controla la actividad de los genes. Otros son complejos, responden a una variedad de señales y actúan como pequeños procesadores que interpretan e integran estas señales, controlando así el encendido y apagado de los genes. La transcripción es, entonces, controlada por los factores transcripcionales que se unen a estos promotores. Los factores transcripcionales pueden dividirse en dos grupos funcionales:

1. **Generales:** comunes a todos los genes, que se unen al promotor junto con la ARN polimerasa.
1. **Específicos:** se unen a sitios reguladores en genes específicos.

Un mismo factor transcripcional puede controlar diferentes genes al mismo tiempo, ya que la secuencia que reconocen en el ADN puede estar presente en el promotor de varios genes.

Los primeros genes en estudiarse fueron los genes virales y aquellos que codifican para proteínas que participan en la regulación del ciclo celular. Todos estos genes contienen una secuencia altamente conservada denominada *caja TATA* (timina-adenina-timina-adenina), que se encuentra 25-35 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (posición 25, 35) (figura 7-3). Estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que el cambio de un solo nucleótido en esta secuencia disminuye de forma espectacular la transcripción de los genes controlados por ella. Existen genes que se transcriben constantemente, denominados *genes de expresión constitutiva*, como por ejemplo, el gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GA3PDH), la β-actina y el ARN ribosomal 18S. Estos genes no contienen caja TATA, pero sí regiones ricas en GC, reconocidas por factores transcripcionales especiales.

Además del promotor, la transcripción de la mayoría de los genes eucarióticos se regula por otras secuencias en el ADN, llamadas *potenciadores (enhancer)* o inhibidores *(silencer)*, que se localizan a cientos o miles de bases de distancia del sitio de inicio de la transcripción (figura 7-4). Mutaciones en los genes que codifican para factores transcripcionales pueden ocasionar que éstos actúen activando o inactivando genes sin control.

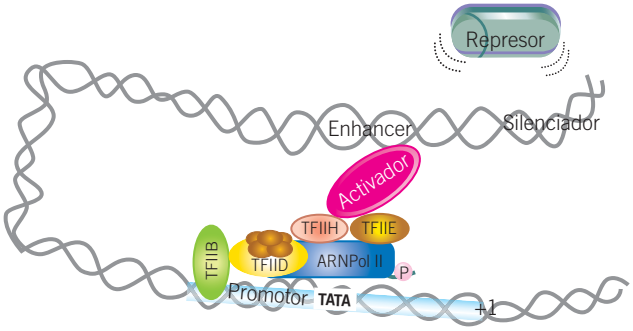


Figura 7-4. Potenciadores y silenciadores en el control de la expresión génica.

La regulación de la transcripción en eucariotes es mucho más compleja que en procariotes, principalmente por dos razones:

a) Los factores transcripcionales actúan a distancia del sitio de inicio de la transcripción.
b) La ARN polimerasa eucariótica (ARN polimerasa II) requiere de la acción conjunta de un grupo de al menos 15 proteínas reguladoras denominadas *factores generales de la transcripción*, que se ensamblan de manera coordinada y secuencial en el promotor de los genes y que son necesarias para la acción de la ARN polimerasa II.

Factores generales de transcripción

El hallazgo de que la ARN polimerasa eucariótica por sí sola no puede iniciar la transcripción condujo al descubrimiento de proteínas accesorias, conocidas como *factores generales de la transcripción*.

Estas proteínas, TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH y TFIIJ (TF, *transcriptional factor*, y II, por asociarse a la ARN polimerasa II), se ensamblan de forma coordinada en el promotor de los genes y asisten la unión y acción de la ARN polimerasa. El ensamblaje se inicia con la unión del factor transcripcional TFIID a la secuencia TATA en el promotor (formada por dos proteínas diferentes: TBP (*TATA binding protein*) y TAF (*TBP associated factor*). Después se incorporan los factores TFIIA y TFIIB, y sólo entonces la ARN polimerasa II, formando complejo con TFIIF se une al promotor. TFIIE, TFIIH y TFIIJ se acoplan después a este complejo. Una vez reunidos todos estos elementos, TFIIE, con su acción de helicasa, desenrolla el ADN y TFIIH fosforila la ARN polimerasa II en su dominio CTD, lo que produce su activación. En este momento se liberan todos los componentes del complejo de los factores generales de transcripción y se inicia la transcripción de un gen determinado (figura 7-5).

Factores transcripcionales inducibles

Es un grupo de factores transcripcionales que pueden actuar como activadores, si estimulan la transcripción de los genes, o como represores, si la inhiben. Un solo gen puede controlarse mediante la unión de varios factores transcripcionales. Por otro lado, un mismo factor transcripcional puede unirse a los potenciadores de varios genes y controlar la expresión de todos ellos. Cada tipo celular tiene un patrón característico de expresión de genes, determinado por el grupo de factores transcripcionales inducibles expresados en esa célula. A esto se le conoce como *expresión célula-específica* o *tejido-específica*.

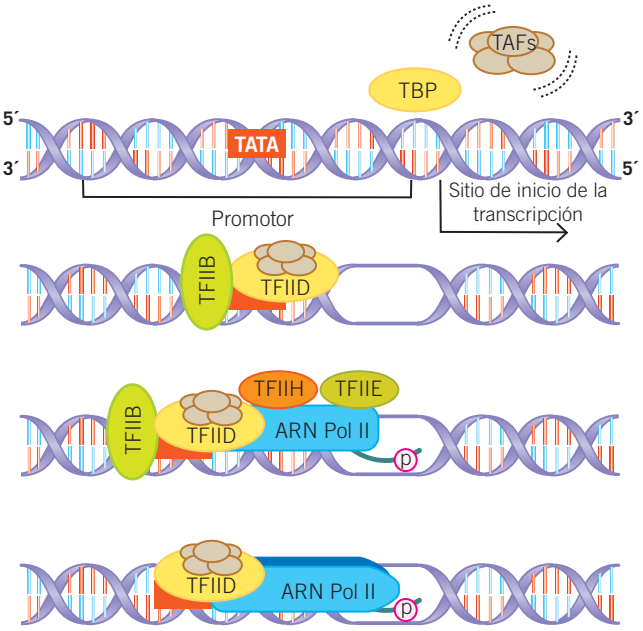


Figura 7-5. Maquinaria basal de transcripción.

Estructura de los factores transcripcionales

Debido a que los factores transcripcionales son proteínas, su análisis conformacional y cristalográfico ha permitido conocer que todos ellos presentan dominios con estructura similar que les permiten unirse al ADN o a otros factores transcripcionales y formar grandes complejos que regulan la expresión de los genes. En su región de contacto con el ADN, existe una serie de aminoácidos básicos (cargados positivamente) que le facilitan su unión al ADN, que tiene carga negativa. Las posibles estructuras que pueden observarse en un factor transcripcional son cuatro: hélice-vuelta-hélice, hélice-asa-hélice, dedos de cinc y *zipper* de leucinas.

Hélice-vuelta-hélice

Fueron las primeras proteínas de unión al ADN que se reconocieron; de hecho, la mayoría de las proteínas que se unen al ADN tienen esta conformación. Estas proteínas constan de dos estructuras α-hélice, unidas por una cadena corta de aminoácidos, lo que provoca un giro específico en cada una de las α-hélice y facilita su unión al ADN. Un ejemplo de este tipo de factor transcripcional es el represor del operón Lac.

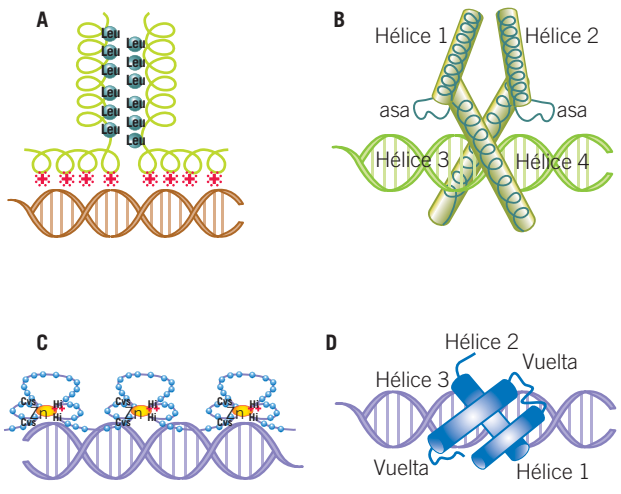


Figura 7-6. Estructuras de los factores transcripcionales.

Hélice-asa-hélice

Los factores transcripcionales que presentan esta estructura constan de una α-hélice corta conectada por una horquilla a otra α-hélice igual o más grande, formando homodímeros o heterodímeros. El factor transcripcional Oct-1 presenta esta conformación.

Dedos de cinc

Un tercer grupo de proteínas de unión al ADN está formado por una estructura α-hélice y una β-plegada, o dos α-hélices unidas por uno o más átomos de cinc, que adquiere una forma similar a uno o más dedos. Entre los factores transcripcionales que presenta esta estructura están los receptores de esteroides, los glucocorticoides y estrógenos, y el factor transcripcional SP1 (de los descritos en primer lugar).

Zipper de leucinas

La mayoría de los factores transcripcionales con esta estructura forman dímeros para lograr una unión más fuerte al ADN, que se facilita por la presencia de residuos de lisina en los dos monómeros alternados cada siete u ocho aminoácidos. Las lisinas les permiten realizar interacciones hidrofóbicas que mantienen unidas a las dos subunidades.

El factor transcripcional AP-1 es un buen ejemplo de este tipo de estructura. Esta proteína es un heterodímero formado por dos subunidades llamadas Fos y Jun (figura 7-6).

Activación de los factores transcripcionales

La actividad de los factores transcripcionales se regula en su mayoría por modificaciones postranscripcionales; es decir, la proteína se produce pero permanece inactiva hasta que no recibe una señal de activación. Sin embargo, hay diversos mecanismos por los cuales los factores transcripcionales pueden activarse, que se describen en los siguientes párrafos.

1. **Transcripción.** El factor transcripcional se sintetiza sólo cuando se necesita y se degrada rápidamente por proteólisis de tal manera que nunca se acumula.
2. **Unión ligando-receptor.** Un factor requiere de la unión de un ligando para activarse. Un ejemplo de este tipo de factor transcripcional es el receptor de esteroides. El receptor se encuentra inactivo en el citoplasma. Los esteroides, al ser liposolubles, atraviesan la membrana celular por difusión simple, se unen a su receptor en el citoplasma y lo activan, propiciando su transporte hacia el núcleo y su unión al ADN en los promotores de los genes que contengan la secuencia de reconocimiento.
3. **Fosforilación.** Es el mecanismo más común para la activación de la mayoría de los factores transcripcionales y consiste en la adición de un grupo fosfato por una cinasa en aminoácidos predeterminados, generalmente serina o treonina del factor transcripcional. El factor transcripcional AP-1 es un ejemplo característico de este mecanismo de activación.
4. **Formación de complejos.** El acoplamiento de varias proteínas da como resultado un factor transcripcional activo con capacidad de migrar al núcleo y unirse al ADN. El factor transcripcional AP-1, formado por dos subunidades, Fos y Jun, es un ejemplo característico de este mecanismo de activación.
5. **Liberación del inhibidor.** El factor transcripcional se encuentra inactivado por un inhibidor. Cuando éste es fosforilado sufre un cambio conformacional que libera el factor transcripcional y permite su traslado al núcleo y su unión al ADN. El factor transcripcional NF-κB se activa a través de este mecanismo en donde la proteína que funciona como inhibidor es llamada I-κB (figura 7-7).

Regulación mediante potenciadores (*enhancer*)

En 1979 se identificaron ciertas secuencias de nucleótidos en los promotores de genes eucariotes a las que se les llamó *potenciadores (enhancer)*. Estas secuencia sirve como sitio de anclaje de factores transcripcionales inducibles, los cuales, mediante un cambio conformacional y formando una horquilla, interactúan directamente con los factores generales de la transcripción y la ARN polimerasa, para inducir la transcripción.

De esta manera, la región en el ADN que controla la expresión de un gen está conformada por el promotor y uno o más potenciadores; por lo tanto, la región reguladora es una secuencia de ADN de tamaño variable que controla la velocidad de transcripción. La mayoría de los factores transcripcionales inducibles actúan en complejos, aunque algunos lo hacen de forma individual. De la misma manera, la mayoría de ellos activan la transcripción, aunque también algunos son proteínas represoras que la suprimen. Aunado a esto, un mismo factor transcripcional

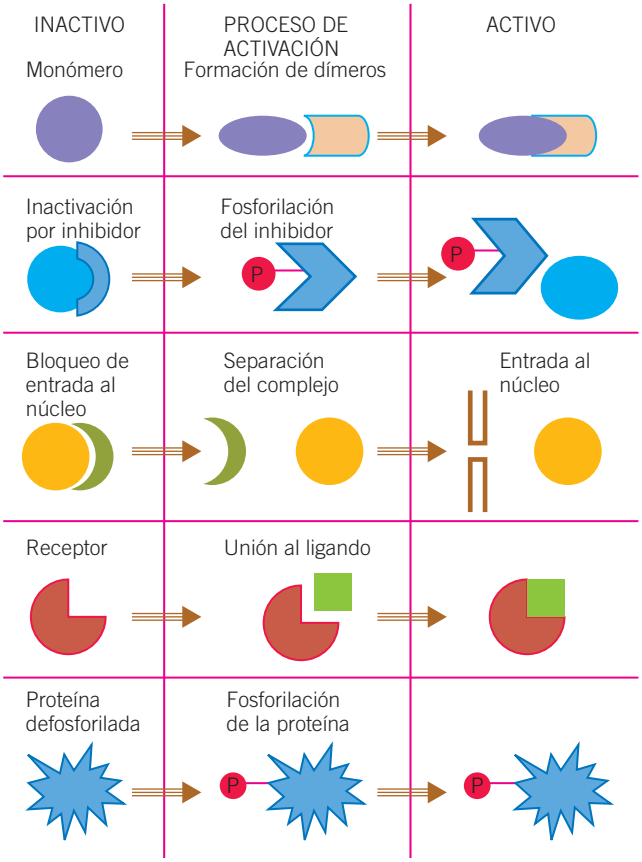


Figura 7-7. Mecanismos de activación de los factores transcripcionales.

puede formar parte de complejos que activan o inhiben la transcripción.

Control postranscripcional

El control en el inicio de la transcripción es la forma predominante de regulación génica; sin embargo, existen otros controles menos comunes que modulan la expresión de un gen en el paso de ARN a proteínas conocidos como controles postranscripcionales, descritos a continuación y que se enlistan en el cuadro 7-1.

Atenuación de la transcripción

En organismos procarióticos, como las bacterias, la expresión de ciertos genes es inhibida por la terminación prematura de la transcripción, un fenómeno conocido como *atenuación de la transcripción.* En este proceso la cadena de ARN recién sintetizada adopta una estructura que interactúa con la ARN polimerasa, impide su avance e interrumpe la transcripción. Cuando la célula requiere la proteína codificada por este gen, algunas proteínas reguladoras se unen a la cadena naciente de ARN y reacomodan su estructura, con lo que se permite la restauración de la transcripción y, por lo tanto, la producción de una molécula de ARNm completa.

La atenuación de la transcripción en eucariotes puede ocurrir por distintos mecanismos. En células infectadas por adenovirus o retrovirus (por ejemplo, el virus de inmunodeficiencia humana, VIH) las proteínas que se ensamblan en el promotor determinan si la ARN polimerasa puede truncar la transcripción. Estas proteínas pueden ser diferentes en distintas células y la célula puede controlar el nivel de atenuación de un gen en particular.

Control del procesamiento del ARN

Durante la transcripción, en organismos eucariotes se producen ARN precursores llamados *tránscritos primarios* o *pre-ARNm*, posteriormente procesados para producir una molécula de ARNm madura a través del proceso de corte y empalme *(splicing)*. El tránscrito primario es aproximadamente 10 veces más grande que el ARNm maduro. En este procesamiento, los intrones se eliminan del tránscrito dejando exclusivamente los exones, para constituir un ARNm maduro. Un mismo tránscrito primario puede procesarse de diversas formas, lo que da lugar a diferentes ARNm y, por lo tanto, a diferentes cadenas polipeptídicas.

Algunos genes presentan *secuencias ambiguas*; es decir, regiones que en unos tejidos se consideran exones y en otros, intrones, por lo que en cada tejido se realiza un procesamiento diferente conocido como procesamiento o *splicing* alternativo, que origina en cada uno de ellos ARNm y proteínas diferentes.

Edición del ARN

Este tipo de control postranscripcional se refiere a la modificación en una o más bases en la secuencia del ARNm maduro que provoca cambios en el mensaje original. La modificación más frecuente es el cambio de citocina por uracilo, con lo que la secuencia original se altera hasta en un 50%. El proceso de edición del ARNm es limitado en mamíferos y sólo se ha observado en los genes de ApoB y de la proteína del canal de calcio en el cerebro. En el primer caso, una citocina se cambia por un uracilo, con lo que se genera un codón de terminación prematuro que produce una versión truncada de la proteína. En el segundo caso, se cambia un nucleótido a la mitad de la molécula de ARNm; esto origina el reemplazo de un aminoácido por otro, lo que altera la permeabilidad del canal de calcio.

Control del transporte de ARN

Transporte del núcleo al citoplasma. El ARN, como cualquier otra molécula que sale del núcleo, lo hace a través del complejo de poro. Para poder salir del núcleo, el ARN sufre tres modificaciones importantes: la adición del nucleótido modificado 7 metilgualnosina en el extremo 5', la adición de la cola de PoliA en el extremo 3' y la eliminación de los intrones *(splicing)*.

Cuadro 7-1. Mecanismos por los cuales puede ser regulada la expresión de un gen.

Mecanismo	Acción	Sitio en la célula donde se realiza	Consecuencia
Pre-transcripcional	Metilación de histona H3.	Núcleo	Inhibición de la Transcripción.
Pre-transcripcional	Acetilación de histonas.	Núcleo	Inducción de la Transcripción.
Transcripción	Unión de factores transcripcionales al ADN.	Núcleo	Dependiendo si el factor transcripcional es inductor o inhibidor se estimula o se inhibe la transcripción.
Atenuación de la transcripción	El ARN naciente adquiere una conformación especial que impide que la ARN pol continúe su síntesis.	Núcleo	No hay síntesis completa de la cadena de ARN.
Procesamiento del ARN	Eliminación diferencial de intrones y conservación de exones.	Núcleo	Un mismo ARNhn da lugar a ARNm diferentes.
Edición del ARN	Modificación de una o más bases en un ARNm maduro.	Núcleo	Cambio de uno o más codones en el ARNm maduro.
Transporte del ARN	Por señales específicas el ARN es exportado al citoplasma.	De núcleo a citoplasma	No sale del núcleo y no se traduce.
Transporte del ARN	El péptido señal induce el transporte del ARN al RER para la síntesis de proteínas de exportación		La falta del péptido señal hace que las proteínas se sinteticen en ribosomas libres y permanezcan dentro de la célula.
Traducción	Reconocimiento de secuencias específicas en el ARNm por factores de la traducción	Citoplasma	La ausencia de estas señales no permite que se realice la traducción.
Adición de grupos químicos a proteínas	Formación de proteínas compuestas	Citoplasma	Generación de proteínas funcionales y activas.
Inhibidores de la traducción	Unión de proteínas inhibidoras al extremo 5´ del ARNm	Citoplasma	Inhibición de la traducción.
Degradación de ARNm	Eliminación de la cola de poli A.	Citoplasma	Se degrada el ARNm y se detiene su traducción.
Interrupción de la traducción	Modificación del marco de lectura que genera un codón de paro prematuro.	Citoplasma	Producción de proteínas truncadas.

Cuando una molécula de ARNm cruza por un poro nuclear y se introduce en el citoplasma, se encuentra con los ribosomas, que la traducen en una cadena polipeptídica. Si el ARNm codifica para una proteína de secreción o de membrana, la presencia de un péptido señal en la región aminoterminal determina su transporte hacia el retículo endoplásmico. La célula reconoce este péptido tan pronto como sale del ribosoma; entonces, el complejo formado por el ribosoma, el ARNm y la proteína naciente se dirige a la membrana del retículo endoplásmico, donde la cadena polipeptídica terminará de sintetizarse. En otros casos la proteína entera es sintetizada por ribosomas libres en el citosol, y señales en su estructura la dirigen al sitio en la célula en donde se necesita.

Control de la traducción

La traducción comienza cuando la subunidad pequeña del ribosoma reconoce el codón de inicio (AUG) en el ARNm. Los nucleótidos vecinos participan en este reconocimiento, en donde se encuentran la secuencia *shine-dalgarno* en ARNm procariotes y la secuencia *kozak* en eucariotes (véase el capítulo 6). Si el reconocimiento es deficiente, la subunidad ribosómica ignorará el primer codón AUG y saltará hasta el segundo o el tercero. Este fenómeno, conocido como *búsqueda de escape*, es una estrategia para producir dos o más proteínas diferentes en su extremo aminoterminal a partir de un mismo ARNm.

En ARNm virales la traducción se realiza usando este tipo de mecanismos. Estos ARNm cuentan con secuencias de nucleótidos específicas, llamadas *sitios internos*, que no son reconocidas por el ribosoma, y la traducción se inicia en el segundo codón AUG.

Modificaciones postraduccionales. Adición de grupos químicos a proteínas

Otro mecanismo por el cual se puede regular la expresión de un gen es la adición de diferentes grupos químicos a cualquiera de los aminoácidos que conforman una proteína. Sin la adición de estos compuestos la proteína no se convertirá en una proteína madura y funcional. Entre las

adiciones más comunes se encuentran las acetilaciones, las carboxilaciones, las metilaciones, las hidroxilaciones y las fosforilaciones.

Proteínas inhibidoras de la traducción

La expresión de un gen puede inhibirse si la traducción se bloquea mediante la unión de proteínas inhibidoras en el extremo 5´ del ARNm cerca del sitio de inicio de la traducción. Este tipo de mecanismo se llama *control negativo de la traducción*.

Control de degradación del ARNm

Los ARNm en células bacterianas son muy inestables; su vida media es de pocos minutos. En células eucarióticas el ARNm es más estable, de alrededor de 30 minutos, aunque existen otros con vidas medias más largas, por ejemplo el de la β-globina tiene una vida media de 10 horas. Los ARNm más inestables a menudo codifican para proteínas reguladoras cuya síntesis cambia rápidamente ante un estímulo. La inestabilidad de estos ARNm se debe a que su secuencia rica en A y U en la región 3' no traducida (UTR) acelera la eliminación de la cola de poli-A y, por ende, la degradación del ARNm. Otros ARNm son reconocidos en sus extremos 3' UTR por endonucleasas que cortan el ARNm. Sin embargo, la estabilidad de un ARNm cambia en respuesta a señales extracelulares.

Por ejemplo, el ARNm que codifica para las histonas, en la fase S del ciclo celular, periodo en el que se sintetiza el ADN y se requiere de nuevas histonas para su empaquetamiento, tiene una vida media de 1 hora; cuando termina la fase S, los ARNm se degradan en pocos minutos. De igual forma, si la síntesis de ADN es inhibida con algún fármaco, la acumulación de histonas libres induce la degradación de su ARNm. Por ello, la degradación del ARNm depende de las señales que actúen en su extremo 3', donde se encuentra la cola de poli-A.

Cola de poli-A

La adición de la cola de poli-A a un ARNm recién sintetizado ocurre en organismos eucariotes y se lleva a cabo en el núcleo. Su longitud es variada y cuenta con un promedio de 200 nucleótidos. Una vez en el citoplasma, esta cola se va acortando con el tiempo. No se han observado colas de menos de 30 adeninas, lo que sugiere que éste es el tamaño mínimo requerido para mantener la estabilidad del ARNm.

Interrupción de la traducción

El proceso de síntesis de proteínas es automático, esto es, una vez iniciado debe terminarse. En casos especiales, un proceso denominado *recodificación traduccional* puede alterar el proceso de traducción. Los tipos de recodificación observados con más frecuencia son los cambios en el marco de lectura y se observan sobre todo en virus; los retrovirus lo hacen de manera ordinaria. Estos virus producen un solo ARNm del cual se sintetizan tanto las proteínas de la cápside (proteínas Gag) como sus enzimas (transcriptasa inversa, integrasas, proteasa y proteínas Pol). Como los virus necesitan más proteínas Gag que Pol provocan un ajuste en su ARNm e inducen la formación de un codón de terminación al finalizar la región Gag, asegurando que sólo se produzcan las proteínas de esta región y eliminando temporalmente la síntesis de las proteínas Pol.

Existe un último mecanismo de control de la expresión de un gen: la presencia de moléculas de ARN complementarias al ARNm que, al unirse a él, bloquean su transcripción. A este tipo de estrategias se le conoce como ARN antisentido o ARN de interferencia y regulan la expresión de algunos genes tanto en células procariotas como eucariotas (véase el capítulo 27, Terapia génica). Este mecanismo se describió inicialmente en organismos inferiores, pero ahora se sabe que funciona en la mayoría de los organismos. Los estudios experimentales con este tipo de moléculas administradas exógenamente son de gran interés, ya que el bloqueo en la síntesis de una determinada proteína permite entender su funcionamiento completo y comprender de forma más integral su papel en los procesos evolutivos. Se cree que las primeras células carecían de ADN y proteínas y sólo contenían ARN. Estas células primitivas utilizaban el mecanismo antisentido para regular sus funciones (cuadro 7-1).

Ejercicios de integración

1. La expresión de un gen en eucariotes se regula en diferentes niveles: unos se realizan en el núcleo y otros en el citoplasma. Indique cuáles suceden dentro del núcleo y cuáles fuera de él.
2. Indique si es falso o verdadero:
   - Para la expresión de genes procariotes es necesario que el ARNm salga del núcleo y sufra el proceso de *splicing* _____
   - La ARN polimerasa fosforila los factores transcripcionales para que induzcan la expresión de los genes _____
   - En la regulación pretranscripcional participa la estructura de la cromatina, donde la acetilación de las histonas desempeña un papel muy importante. _____
   - La temperatura y el medio ambiente son factores clave en la expresión de genes en procariotes. _____
   - Los operones son conjunto de genes presentes exclusivamente en mamíferos. _____
3. Indique a qué tipo de organismo pertenecen las siguientes estructuras o procesos:

	Eucariotes	Procariotes
Operón Lac		
Factores generales de la transcripción		
Promotores		
ARN polimerasa		
***Enhancer* o potenciadores**		
***Splicing* (corte o empalme)**		
Histonas		
Adición de la cola de poli A		

Bibliografía

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Control of gene expression. *Molecular biology of the cell,* 4ª ed. Nueva York: Garland Science, 2002:365-465.

Karp G. El núcleo celular y el control de la expresión génica. *Biología celular y molecular,* 6ª ed. México: McGraw-Hill, 2011:455-532.

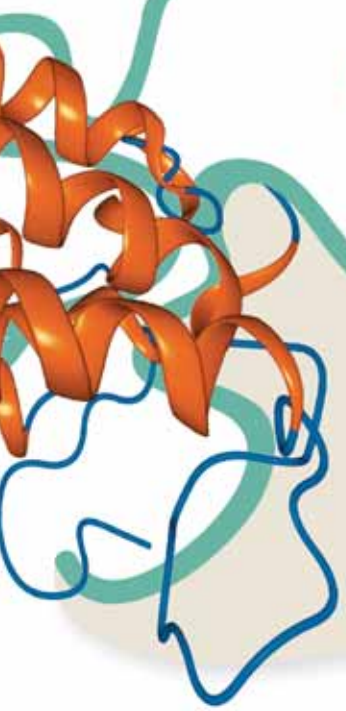
Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R., Expresión del genóma *Biología molecular del gen,* 5ª ed. México, DF: Editorial Médica Panamericana, 2006:370-491.

Pabo C.T., Sauer R.T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Ann Rev Biochem,* 1992;61:1053-1095.

Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. Regulación. *Biología molecular del gen,* 5ª ed. México, DF: Editorial Médica Panamericana, 2005:370-491, 513-613.

Lewin B. Regulation of transcription: factors that activate the basal apparatus. *Genes IX,* 7ª ed. Nueva York: Oxford University Press, 649-684.

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Regulation of transcription initiation. *Molecular cell biology,* 4ª ed. WH Freeman and Company, 2000:341-403.



Capítulo 8

Mutaciones

María Guadalupe Sánchez Parada / Belinda Claudia Gómez Meda

Introducción

Todos los organismos están sujetos a sufrir cambios en su ADN debido al metabolismo propio o por efecto del medio ambiente, lo que los hace presentar variabilidad genética dentro de una misma especie. Esta variabilidad se debe en gran parte a los procesos evolutivos a través del tiempo que involucran mutaciones estables. Estas mutaciones pueden ser heredables si suceden en células germinales o desaparecer cuando el individuo muere, si se presentan en células somáticas. Hugo de Vries, botánico alemán redescubridor de Mendel, describió por primera vez la presencia de mutaciones en 1901. Posteriormente, Herman Joseph Muller pudo relacionar la exposición a los rayos X con el aumento de la tasa de mutaciones.

Mutación

Aun cuando los procesos de replicación del material genético son muy precisos, no son perfectos, por lo que pueden producirse errores que generan cambios. Una mutación es una variación espontánea o inducida del genoma, un cambio permanente y heredable en la secuencia del ADN, en nucleótidos, o bien en la disposición del ADN en el genoma.

Estos cambios o mutaciones se deben a alteraciones de la información genética. Las consecuencias dependen entonces del nivel de afectación: desde cambios en la secuencia nucleotídica, en los genes o los productos génicos, hasta en los tipos celulares involucrados.

Todos los seres vivos cuentan con sistemas de verificación y reparación de los procesos celulares. En el caso de la replicación del ADN existen sistemas de reparación específicos y bien coordinados, pero en ocasiones las lesiones del ADN que escapan a esta verificación serán las causantes de ocasionar mutaciones; por lo tanto, la efectividad de la lesión dependerá tanto de la tasa de división celular, como de la eficiencia de los mecanismos de reparación contra el aumento en las lesiones al ADN. Cuando ambos factores están incrementados, el resultado será una mayor generación de mutaciones o mutagénesis (y carcinogénesis).

Un gen tiene un rango de mutación normal, que se expresa como el número de mutaciones nuevas por *locus* por generación; este rango es de aproximadamente 1×10^{-6} mutaciones por *locus* por generación.

Las mutaciones ocurren con mucha frecuencia, constituyen la base de muchas enfermedades genéticas y hereditarias, e incluso del cáncer y de lo que se conoce como *variación normal*.

Clasificación de las mutaciones

Las mutaciones pueden clasificarse desde diferentes enfoques. Pueden ocurrir tanto en los genes como en los cromosomas, en un tejido somático o en un tejido germinal, lo que define una mutación somática y germinal, respectivamente.

Mutación germinal

Es aquella que ocurre en la línea germinal, las células sexuales (óvulo y espermatozoide). Este tipo de mutaciones se transmiten a la siguiente generación si una célula mutada participa en la fecundación. Las mutaciones germinales no dañan al individuo en sí mismo; esto es, un individuo con un fenotipo normal y sin antecedentes familiares de alteraciones fenotípicas puede ser portador de células germinales mutadas no detectadas, que sólo se detectarán si se incorporan a un cigoto, de tal forma que al ser heredadas podrían desencadenar una enfermedad.

Mutación somática

Es aquella que ocurre en cualquier célula del cuerpo, excepto en las células germinales, por lo que no se transmiten a la

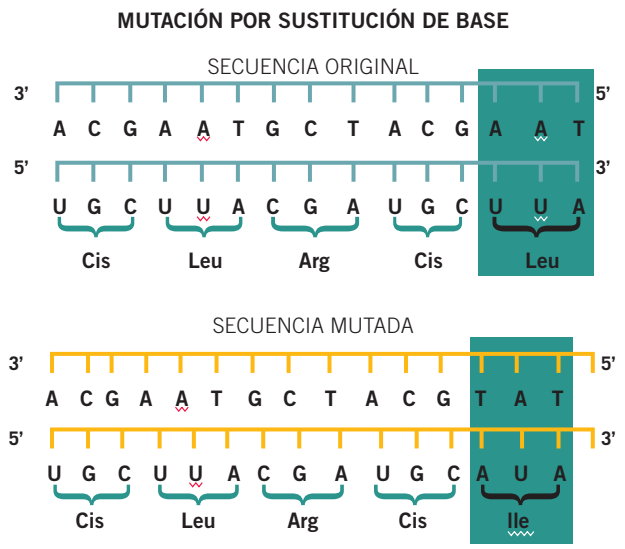


Figura 8-1. Mutación por sustitución de un nucleótido.

descendencia, sólo a las células que se originen a partir de ésta, y desaparece al morir el individuo. Si la mutación se produce en un tejido cuyas células están en división, existe la posibilidad de que surja un clon mutante que descontrole la célula de tal forma que se pueda desencadenar una neoplasia. En cambio, si la mutación ocurre en una célula que no volverá a dividirse, entonces su efecto será mínimo o nulo (el mejor escenario posible).

Las mutaciones que se producen en los casos de cáncer ocurren en aquellos genes denominados *protooncogenes* y genes supresores de tumores, que regulan la división celular. Si estos genes mutan se induce un estado de división incontrolada que da lugar a un grupo de células denominadas *tumor*.

De acuerdo con la magnitud del material genético afectado, las mutaciones suelen clasificarse en tres tipos: puntuales o génicas, cromosómicas y genómicas.

Mutación puntual o génica

Ocurre en un par de bases o en un número reducido de bases adyacentes y puede deberse a modificaciones químicas del ADN que cambian una base nitrogenada por otra diferente. La frecuencia con la que se ha descrito que suceden estas mutaciones es en el orden de 1×10^{-10}/par de bases/división celular y 1×10^{-6}/*locus*/generación. De acuerdo con las bases sustituidas, las mutaciones puntuales pueden clasificarse en dos grupos: transición (cambio de un nucleótido por otro de la misma clase; es decir, purina por purina o pirimidina por pirimidina), y transversión (cambio de un nucleótido por otro de diferente clase; es decir, purina por pirimidina o pirimidina por purina). También pueden deberse a alteraciones durante el mecanismo de replicación del ADN, lo que provoca la incorporación de una base errónea en una cadena sencilla de ADN. Una mutación puntual puede regresar a su secuencia original mediante una mutación compensatoria, por medio de un fenómeno denominado *reversión*; es decir, la aparición de una segunda mutación que restaura parcial o totalmente el fenotipo normal. Las mutaciones puntuales no se detectan con el microscopio, ya que el aspecto es igual en un cromosoma portador de una mutación puntual que otro que porta el alelo normal. Este tipo de mutaciones se detecta a nivel molecular, mediante secuenciación directa del fragmento de ADN alterado, que permite detectar cambios en un solo nucleótido (véase el capítulo 17, Secuenciación).

A continuación se presenta la clasificación de las mutaciones puntuales.

Mutación por sustitución de bases

Se produce cuando en una secuencia de ADN se cambia un nucleótido por otro; por ejemplo, el cambio de un nucleótido de citosina por uno de timina. En esta clasificación se incluyen las transversiones y transiciones mencionadas anteriormente (figura 8-1).

Mutación por pérdida de nucleótidos o deleción

Se produce cuando en una secuencia de ADN se pierde un nucleótido y no se sustituye por ningún otro, por lo que se modifica el marco de lectura abierto y, a partir de la mutación, la secuencia de nucleótidos (figura 8-2).

Mutación por inserción de nucleótidos

Se produce cuando en una secuencia de ADN se introducen uno o más nucleótidos que no pertenecen a dicha secuencia modificando el marco de lectura abierta alterando la secuencias de aminoácidos a partir del sitio de la mutación (figura 8-3).

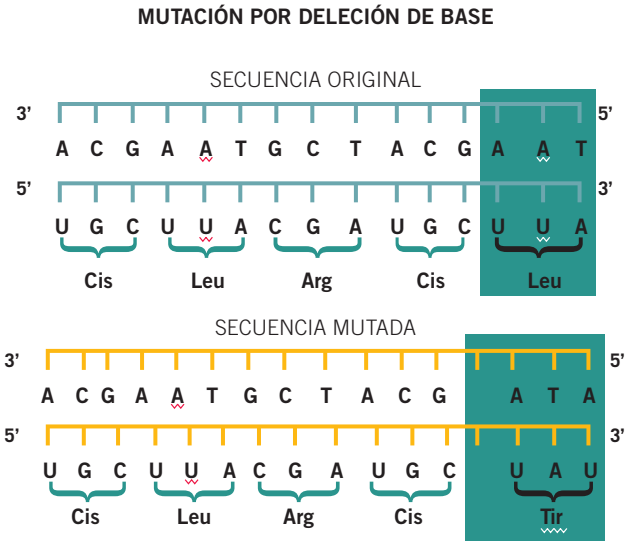


Figura 8-2. Mutación por deleción de un nucleótido.

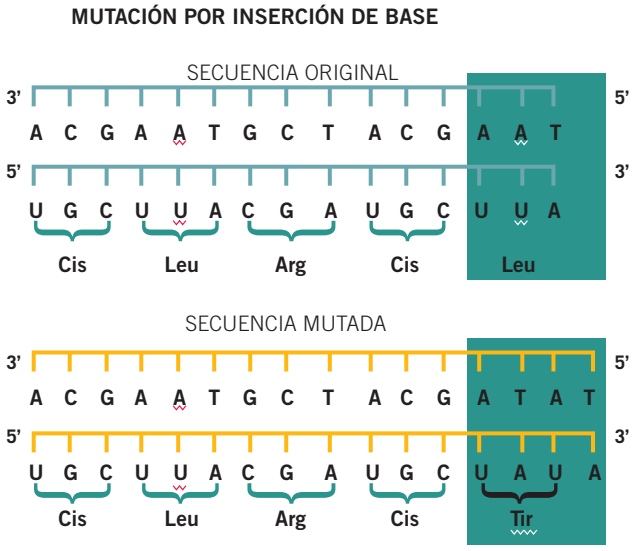


Figura 8-3. Mutación por inserción de un nucleótido.

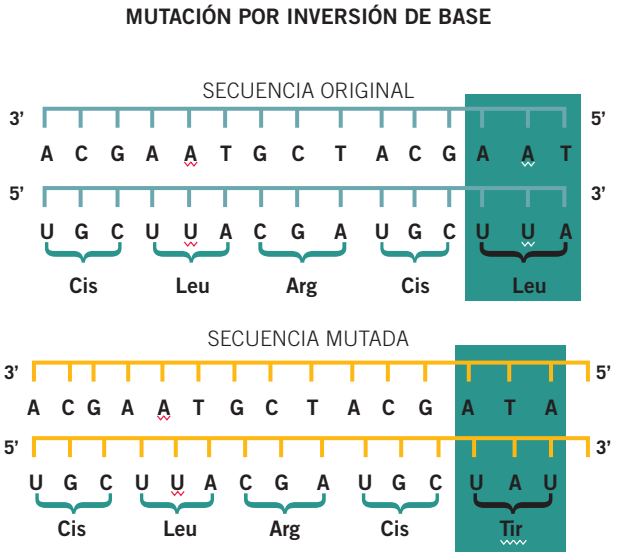


Figura 8-4. Mutación por inversión de un nucleótido.

Mutación por translocación de pares de nucleótidos complementarios

Se produce cuando en una secuencia se da un cambio de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina (en el caso de la transición) o de purina a pirimidina, o viceversa (en el de la transversión).

De acuerdo con el resultado en la secuencia de aminoácidos de las proteínas, las mutaciones puntuales pueden ser:

Mutación neutra

Es la que no tiene un efecto sobre el fenotipo, debido a que el cambio en la secuencia de nucleótidos genera tripletes que codifican para aminoácidos equivalentes como, por ejemplo, AAA (lis)→AGA (arg); ambos, aminoácidos básicos. No hay tanta variación en las cargas y posibles enlaces en el péptido resultante, aunque por la diferencia en la estructura del aminoácido existirán ligeras variaciones en la estructura y la conformación final de la proteína, pero su función aún podría conservarse.

Mutación silenciosa

Es aquella en la que, a pesar de que existe una alteración en la secuencia de nucleótidos, no provoca cambios en el aminoácido que codifica. Esto sucede gracias a que el código genético es degenerado y a que para algunos aminoácidos existe más de un codón, por lo que los cambios en los codones no modifican el resultado de la traducción (véase el capítulo 6). (Figura 8-5).

Mutación sin sentido

Es aquélla en la que se cambia un codón que codifica para un aminoácido por uno de terminación (UAG, UAA, UGA), lo que propicia la terminación prematura de un polipéptido, y da como resultado una proteína truncada (figura 8-6).

Mutación de desplazamiento de marco de lectura

Es aquélla en la que se añaden o eliminan (inserciones y deleciones) un número determinado de bases diferente a tres, por lo que a partir del punto de la mutación, la lectura del código genético se altera y propicia la adición de aminoácidos diferentes a los que estaban codificados originalmente (figuras 8-1 y 8-2).

Mutación de sentido equivocado

Es aquella en la que el cambio de codón que codifica para un aminoácido da como resultado uno de familia, grupo o

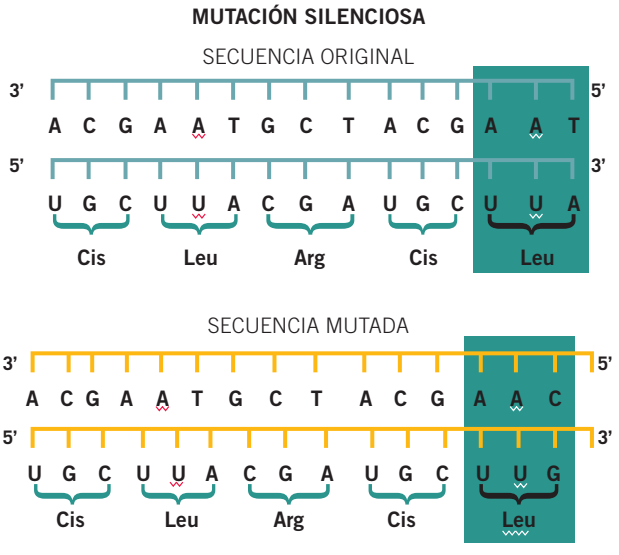


Figura 8-5. Mutación silenciosa.

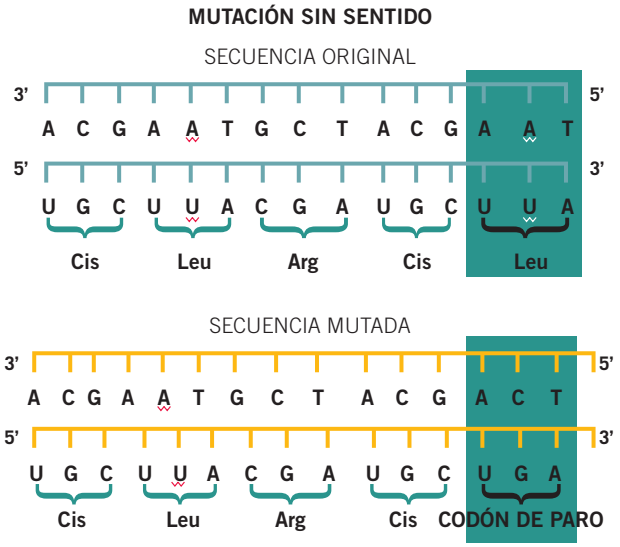


Figura 8-6. Mutación sin sentido.

polaridad diferentes que el original. El cambio en el péptido sí será evidente y drástico en su estructura, y por ende, en su función y actividad final, e incluso puede inhabilitar la proteína.

Mutación cromosómica

Es aquella que involucra el reordenamiento cromosómico resultado de un cambio en la organización de segmentos cromosómicos, o la pérdida o ganancia de cromosomas completos, y provoca anomalías funcionales tanto celulares como orgánicas. Este tipo de mutaciones pueden detectarse mediante análisis al microscopia. Su clasificación es la siguiente:

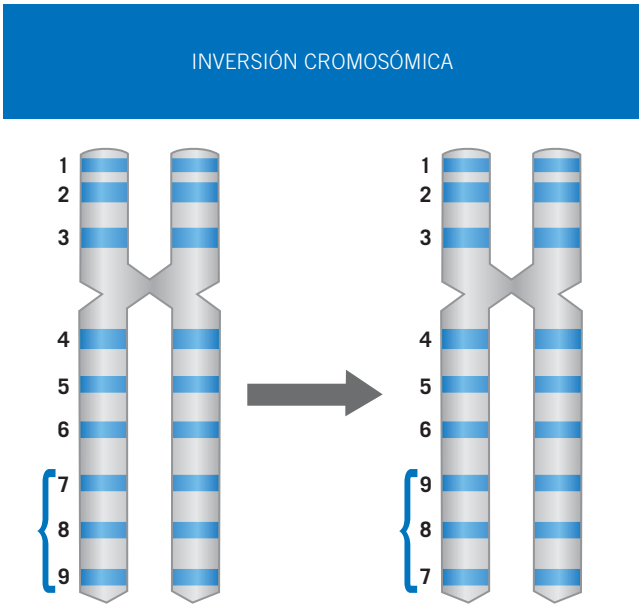


Figura 8-7. Inversión de un fragmento cromosómico.

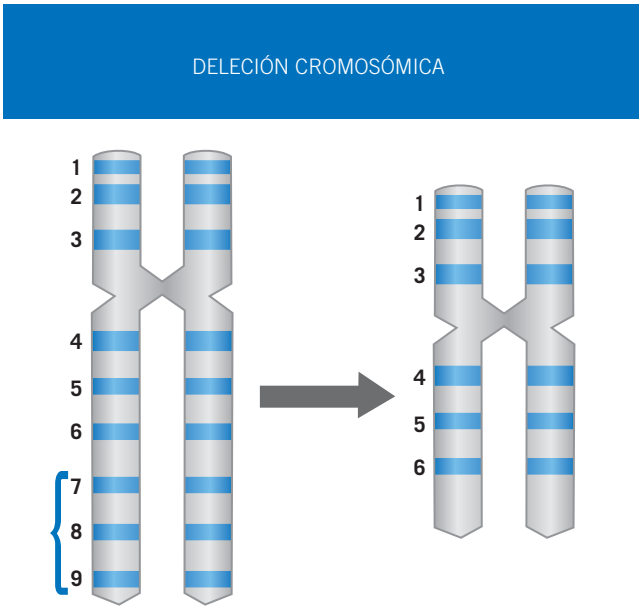


Figura 8-8. Deleción cromosómica.

Mutación por inversión de un fragmento cromosómico

Es aquella que ocurre cuando un segmento del cromosoma se invierte en su orientación dentro de éste, al dar un giro de 180°, debido a una rotura doble. Un ejemplo de inversión cromosómica es el síndrome de Ambras o hipertricosis universal congénita, una variante del síndrome del hombre lobo, que es una inversión en el cromosoma 8 (p11.2q23.1) (figura 8-7).

Mutación por deleción o pérdida de un fragmento cromosómico

Ocurre por la pérdida de un fragmento de cromosoma en uno o varios sitios y se asocia con la ganancia en otro cromosoma. Un ejemplo es el síndrome de Prader-Willi, una enfermedad que cursa con deficiencia mental, hiperglucemia diabética e hipogenitalismo. Se trata de una deleción-inserción en la región (15q11q13) (figura 8-8).

Mutación por duplicación de un fragmento cromosómico

En esta mutación se produce una duplicación de un fragmento cromosómico en uno o varios sitios de éste (figura 8-9).

Mutación por translocación de un fragmento cromosómico

Se da por un cambio en la posición de un fragmento cromosómico; es decir, existe intercambio de segmentos cro-

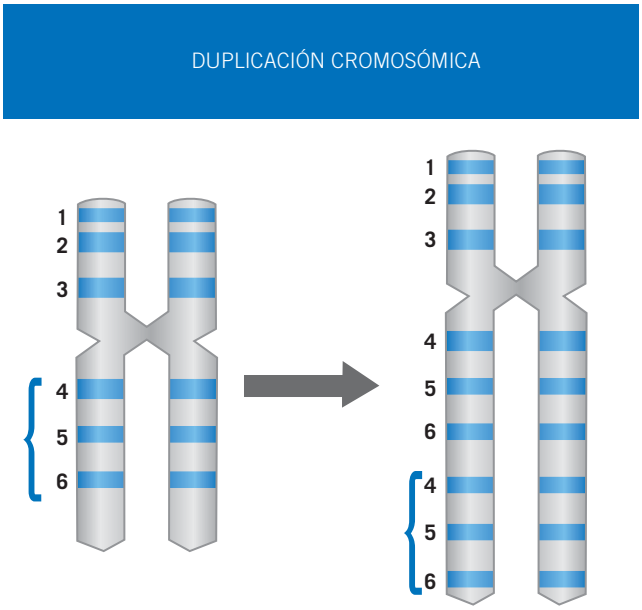


Figura 8-9. Duplicación de un segmento cromosómico.

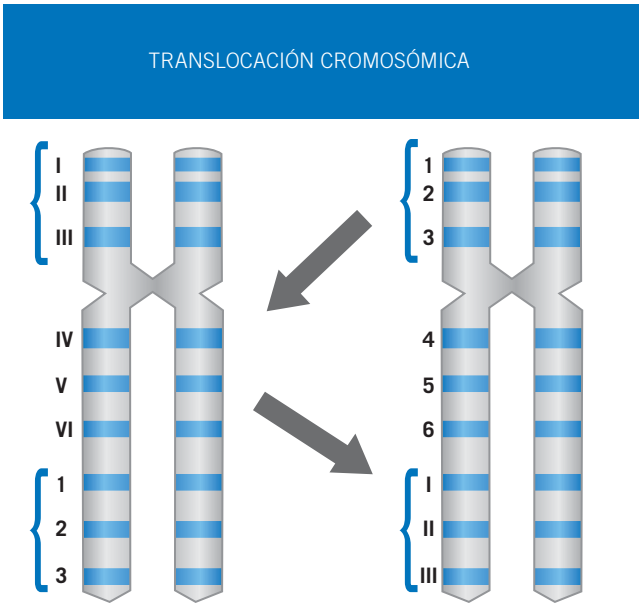


Figura 8-10. Translocación de un segmento cromosómico.

mosómicos, ya sea en el mismo cromosoma, entre cromosomas homólogos o bien entre cromosomas diferentes. Un ejemplo de translocación es la que ocurre en aproximadamente 5% de los pacientes con síndrome de Down: la más frecuente es t(21q14q) (figura 8-10).

Mutaciones genómicas

Son aquéllas en las que existe una segregación cromosómica errónea; es decir, que afectan al número de cromosomas o al genoma en su totalidad. Entre este tipo de mutaciones se encuentran las siguientes:

Poliploidía

En esta mutación se produce un aumento en el número de brazos en un cromosoma en particular, y se presentan como triploidías (3n), tetraploidías (4n), etcétera.

Haploidía

En esta mutación se encuentra una disminución en el número de brazos en un cromosoma.

Aneuploidía

Es aquella en que se modifica el número de copias de un cromosoma; es decir, en lugar de haber dos copias de cada tipo de cromosoma (lo normal), hay uno, tres o cuatro cromosomas (monosomía, trisomía y tetrasomía, respectivamente).

Origen de las mutaciones

Las mutaciones pueden deberse a causas naturales (espontáneas) o inducidas.

Mutaciones naturales o espontáneas

Son aquellas que se producen en condiciones naturales de crecimiento, influidas por el medio ambiente. Éstas representan la base de la evolución.

Mutaciones inducidas

Son aquellas provocadas por algún mutágeno (agente exógeno tanto físico, químico o biológico con la capacidad de provocar mutaciones en una tasa mayor a la basal).

Mutágeno

Un mutágeno es un agente que ocasiona que se incremente la frecuencia en la que ocurren las mutaciones. Son sustancias o agentes que tienen la capacidad de ocasionar cambios en el material genético de las células vivas. La efectividad de una sustancia con capacidad mutagénica se determina por el aumento en la tasa de mutación espontánea que provoca. Se ha descrito que más de la mitad de los carcinógenos son mutágenos.

La acción de los mutágenos debe entenderse por efecto directo que producen sobre la molécula de ADN o por las consecuencias que genera de forma indirecta, cuando se rebasa la capacidad de los mecanismos de reparación para corregir este daño. Un ejemplo de esta acción es el caso de los rayos ultravioleta, dado que con la exposición se provoca la formación de dímeros de timina, lo que no ocasiona directamente la mutación, sino que sólo la induce, ya que la mutación puede generarse en los mecanismos de reparación, al provocar alguna fractura nucleotídica o sustitución de bases (véase el capítulo 9).

De acuerdo con su naturaleza, los mutágenos pueden ser físicos, químicos o biológicos.

- **Agentes físicos:** los agentes físicos son radiaciones que alteran la estructura y la secuencia del ADN. Ejemplos de ello son: la radiación ultravioleta, la radiación ionizante, las partículas alfa, beta y gamma, el choque térmico o las radiaciones electromagnéticas.
- **Agentes químicos:** compuestos que tienen la capacidad de alterar la estructura del ADN al reaccionar directamente con ella o intercalarse entre los nucleótidos, Ejemplos: los **colorantes** de acridina, la formalina, el ácido nitroso, agentes alquilantes, el benzopireno, el ácido bórico, la colchicina, el LSD, la nicotina, el sulfato de cobre o el ácido fórmico, entre otros.
- **Agentes biológicos:** son organismos que tienen la capacidad de alterar la estructura del material genético de su hospedero, al integrarse al ADN de este último, los virus, las bacterias, los hongos, etcétera.

Carcinógenos

El cáncer es un proceso genético en el que una serie de mutaciones en secuencia dirigen a la malignización de una célula en división. Se desencadena como consecuencia de múltiples mutaciones que provocan un crecimiento anormal de las células hasta convertirse en masas de tejido conocidas como *tumores* o *neoplasias*.

El proceso inicia cuando se producen alteraciones irreversibles en la información genética que convierten genes normales en anormales (por ejemplo, protooncogenes en oncogenes), capaces de inducir la iniciación del tumor. Posteriormente, factores ambientales hacen que estas células con información genética alterada desarrollen más mutaciones, y la acumulación de mutaciones ocasiona que escapen a los mecanismos de reparación y a las restricciones de proliferación, lo que las lleva a multiplicarse sin control.

Existen agentes que incrementan la frecuencia de las mutaciones en los organismos expuestos. Estos agentes se denominan *carcinógenos* o *cancerígenos* y pueden ser factores físicos, químicos o biológicos.

Teratógenos

Existen agentes químicos presentes en el ambiente con capacidad de causar daño al ser humano durante el periodo de vida perinatal denominados *teratógenos*. Estos compuestos pueden producir efectos adversos, tanto fisiológicos como bioquímicos, en cualquiera de las etapas del desarrollo, y con frecuencia causan muerte en el útero, abortos, prematurez e intoxicaciones neonatales, entre otros daños.

En particular, los teratógenos (del griego, *teratos*, "monstruo", y *génesis*, "producción") son agentes químicos que, si actúan cuando tiene lugar la embriogénesis, interfieren en el desarrollo normal del embrión, de lo que resultan diversas malformaciones orgánicas. En ocasiones, un mismo compuesto actúa como tóxico y como teratógeno, según la etapa en la que se produjo la exposición a éste.

Los mecanismos conocidos o sugeridos de teratogenicidad son complejos, y se enumeran a continuación:

- Mutación: cambios en la secuencia nucleotídica en el ADN.
- Aberraciones cromosómicas: alteraciones en la cantidad y estructura del ADN.
- Interferencia mitótica: trastorno en el ciclo celular.
- Alteración en la síntesis y función del ADN: trastornos en los procesos de replicación, transcripción y traducción.
- Falta de precursores, sustratos y coenzimas para la biosíntesis.
- Alteraciones con las fuentes de energía: interferencia con el ciclo del ácido cítrico o con la terminal del sistema de transporte de electrones.
- Inhibición enzimática.
- Desequilibrio osmolar: alteraciones en la presión de los fluidos, viscosidades y presiones osmóticas.
- Características de la membrana alterada: desorganización del transporte a través de la membrana y su permeabilidad.
- Otros mecanismos: se ha sugerido una gran cantidad de posibles mecanismos de los que se dispone de escasas pruebas científicas.

En la organogénesis, los teratógenos alteran el desarrollo y pueden producir anomalías congénitas mayores. En el periodo fetal, pueden causar anormalidades morfológicas y funcionales, en particular en el cerebro y los ojos.

Polimorfismos

La presencia de formas alélicas diferentes o polimorfismos, sin ser propiamente una mutación, ya que muchos *loci* se caracterizan por tener cierto número de alelos comunes que permiten caracterizar a una población respecto a fenotipos distintos, es otra situación en la que puede haber variación o diversidad genética. Esta gran diversidad existente entre los miembros de una población da como resultado el hecho de que estos individuos puedan sintetizar proteínas o enzimas modificadas, que en ocasiones pueden estar asociadas también a susceptibilidades para padecer alguna enfermedad. Cada individuo cuenta con una constitución única genéticamente determinada que le permite responder de manera diferente a la influencia ambiental, farmacológica y de la dieta. Esta individualidad es la base para la medicina del futuro, desde un punto de vista genético.

Polimorfismos de un solo nucleótido

Existen polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNP), que pueden deberse a la sustitución de un nucleótido por otro, la deleción de un nucléotido o la inserción de un nucleótido en la secuencia de ADN. Aunque existe modificación del triplete por alteración en la secuencia de nucleótidos, sólo en algunos casos cambia en el aminoácido que se codifica.

Microsatélites

En el genoma existen regiones con repeticiones de secuencias de 9 a 100 pares de bases conocidas como *variable number of tandem repeats* (VNTR), que se utilizan como marcadores moleculares. Las repeticiones de secuencia las cuales oscilan entre 2 a 9 pares de bases son conocidas como *short tandem repeats* (STR).

Preguntas de repaso

1. Explique por qué las mutaciones por inserción o por deleción modifican el marco de lectura abierto.
2. ¿Cuál es la diferencia entre mutación y polimorfismo?
3. Explique por qué en células germinales una mutación se transmite a la descendencia y en células somáticas no.
4. ¿Qué importancia tienen las mutaciones en la evolución de los organismos?
5. ¿Cuál es el origen de las mutaciones?

Bibliografía

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Biología molecular de la célula,* 4ª ed. Barcelona: Omega, 2004:192-234.

Bishop J.B., Witt Kolog, Sloane R.A. Genetic toxicities of human teratogens. *Mutat Res,* 1997;396:9-43.

Ferguson L.R., Ford J.H. Overlap between mutagens and teratogens. Mutat Res, 1997;396:1-8.

Griffiths A, Miller J, Suzuki D, Lewontin R, Gelbart W. Genética, 7ª ed. Madrid: McGraw-Hill, 2002:250-320.

Lewin B. *Genes IX*. Sudbury, MA: Jones & Bartlett Publishers, 2007;545-572.

Lewin B. *Genes VI.* Nueva York: Oxford University Press, 2000:490-590.

Montoya-Cabrera M.A. *Toxicología clínica.* México, DF: Ed Francisco Méndez Cervantes, 1992:225-350.

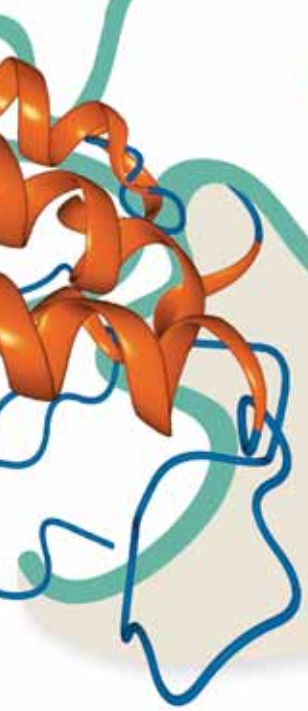
Moore K.L., Persaud T.V.N. *Embriología clínica.* México, DF: McGraw-Hill Interamericana, 1999:290-320.

Shepard T.H. *Catalog of teratogenic agents,* 10ª ed. Baltimore, Londres: The Johns-Hopkins University Press, 2001:215-310.

Suzuki D.J., Griffiths A.J.F., Miller J.H., Lewontin R.C. *Genética,* 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1992:322-430.

Thompson MW, McInnes R.R., Willard H.F. *Genética en medicina,* 4ª ed. Barcelona: Thompson & Thompson, Masson, 1996:340-420.

Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. *Biología molecular del gen,* 5ª ed. Madrid: Médica Panamericana, 2006:422-513.



Capítulo 9

Mecanismos de reparación del ADN

Mayra Guadalupe Mena Enríquez / Lucía Flores Contreras
Ana Soledad Sandoval Rodríguez / Juan Armendáriz Borunda

Introducción

El ADN está expuesto constantemente a agentes físicos, químicos o biológicos que pueden originar mutaciones y alterar la información genética del individuo. Las modificaciones en el ADN pueden surgir por moléculas o mecanismos endógenos del metabolismo celular, errores en el proceso de la replicación del ADN, ciertas infecciones virales e incluso por factores ambientales como la luz ultravioleta, agentes químicos o la radiación ionizante. Estos factores interfieren en procesos como la transcripción y la replicación, e inclusive pueden provocar un descontrol en la división celular. La variabilidad genética también es necesaria para proporcionar adaptabilidad a las especies al cambiante medio ambiente; no obstante, cierta información genética es crucial y su modificación sería incompatible con la supervivencia del organismo. Para preservar la información genética lo más fielmente posible el organismo dispone de mecanismos complejos de reparación del ADN. En la mayoría de las ocasiones los cambios en el ADN no se manifiestan con cambios fenotípicos y no presentan efectos adversos en el organismo; pero algunas mutaciones sí pueden llegar a ser fatídicas, por lo que su persistencia se trata de evitar mediante mecanismos de reparación que implican complejos sistemas enzimáticos que buscan corregir las mutaciones. Varias enfermedades humanas, conocidas como *síndromes de inestabilidad cromosómica*, y ciertos tipos de cánceres están relacionados con fallas en los sistemas de reparación del ADN.

Tipos de daño en el ADN

Las lesiones en el ADN pueden ocurrir espontáneamente o pueden estar causadas por la exposición a agentes mutagénicos. La desaminación, la depurinización y el daño oxidativo de las bases nitrogenadas son algunos de los daños que se producen en el ADN de forma espontánea. La desaminación consiste en la pérdida de grupos amino. En condiciones normales la desaminación de la citosina produce uracilo, base nitrogenada que no forma parte del ADN; esta base se aparea preferentemente con la adenina en lugar de hacerlo con la guanina, produciendo así la conversión de un par de GC en un par de AT (figura 9-1A).

La depurinización consiste en la eliminación del enlace N-glucosídico entre la base nitrogenada y el azúcar, con la consiguiente pérdida de un residuo de adenina o guanina. Como consecuencia aparecen sitios apurínicos en el ADN que conducen a un daño genético importante, ya que durante la replicación estos sitios no pueden unir una base complementaria a la purina original perdiéndose un nucleótido en la cadena de ADN recién sintetizada.

En todos los seres vivos el metabolismo normal aerobio produce especies reactivas de oxígeno como los radicales superóxido (O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo, moléculas que causan daños oxidativos en el ADN. Las principales alteraciones que originan estos radicales libres son la formación de una 8-oxo guanosina y el glicol de timina que bloquean la replicación del ADN si no se reparan (figura 9-1B).

Agentes alquilantes. Añaden grupos alquilo (etilo o metilo) a las bases nitrogenadas y alteran su patrón de apareamiento bloqueando la replicación. Uno de los sitios más propensos a la alquilación es el oxígeno del carbono 6 de la guanina formándose O6-metilguanina, que se aparea de modo incorrecto con la timina, provocando transiciones de un par de bases GC por un par AT.

Agentes intercalantes. Son compuestos que se intercalan entre los nucleótidos del ADN y producen adiciones de un solo par de nucleótidos. Entre los componentes químicos intercalantes se encuentran la proflavina, la acridina y el etidio. Cuando estas adiciones se producen en un gen, puede producirse consecuencias importantes en la traduc-

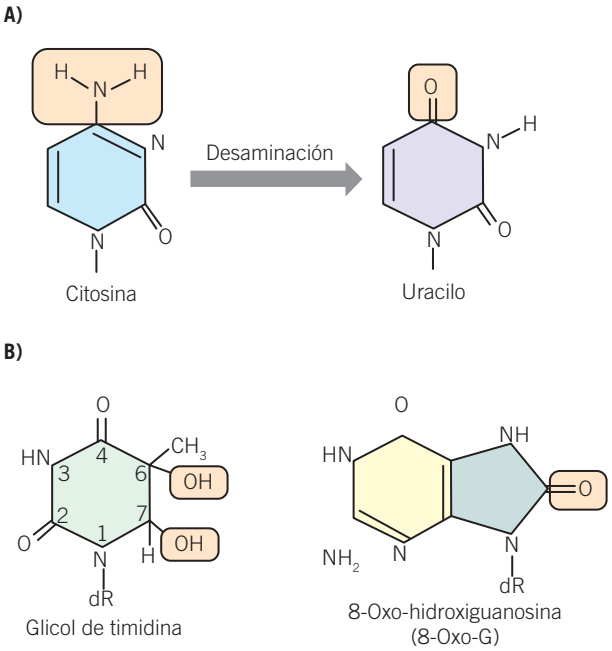


Figura 9-1. Desaminación y daño oxidativo de las bases.

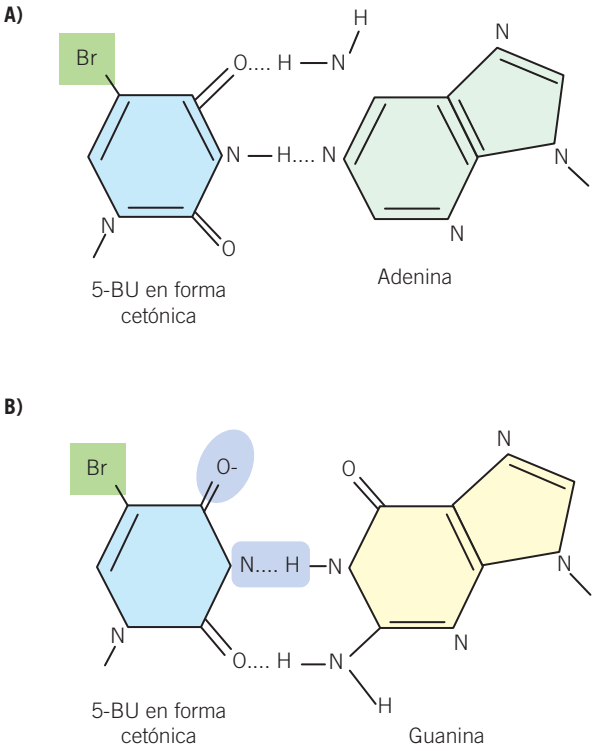


Figura 9-2. Análogos de bases.

ción de su ARNm, ya que altera la secuencia codificadora en su marco de lectura correcto.

Análogos de bases. Son compuestos químicos con estructura similar a la de las bases nitrogenadas normales y se pueden incorporar al ADN en lugar de éstas. Debido a que los análogos de bases presentan diferencias estructurales con las bases convencionales, se aparean de forma incorrecta, lo que provoca errores frecuentes en el proceso de replicación. El 5-bromouracilo (5BrU) es análogo de la timina que contiene un bromo en el carbono 5. En su forma cetónica, el 5BrU forma un par de base con la adenina, mientras que en su forma enólica lo hace con la guanina. Si se incorpora la forma cetónica del bromouracilo, se produce una transición AT-GC y si se incorpora la forma enólica se produce una transición GC-AT (figura 9-2).

Energía ionizante. La exposición del ADN a la luz ultravioleta (UV) produce dímeros de pirimidinas, sobre todo de timinas, cuando hay dos timinas consecutivas en la misma cadena de ADN. La luz UV produce que se formen enlaces covalentes entre dos pirimidinas contiguas, lo que interfiere con la unión normal de las bases nitrogenadas con la cadena complementaria. La radiación UV induce también transiciones GC–AT, transversiones, mutaciones con cambio de marco de lectura, duplicaciones y deleciones (véase el capítulo 8). La radiación ionizante produce daño directo en las bases nitrogenadas del ADN e induce la gene-ración de especies reactivas de oxígeno. Además, produce roturas del enlace N-glucosídico que conducen a la formación de sitios apurínicos, así como rompimientos en la doble cadena del ADN, responsables de efectos letales en la célula. Estas lesiones ocasionan cambios permanentes en el ADN que pueden alterar la secuencia codificadora o reguladora de un gen e impedir el uso del ADN como plantilla para la replicación y transcripción.

Sistemas de reparación del ADN

Para minimizar el daño del material genético el organismo dispone de diversos sistemas de reparación que se activan dependiendo del tipo de daño provocado en el genoma. Estos mecanismos de reparación se pueden clasificar en cuatro categorías: reparación directa, reparación por escisión, reparación de emparejamientos erróneos (apareamientos incorrectos) y reparación de roturas de doble cadena.

Reparación directa

La reparación directa involucra sistemas que eliminan directamente el daño en el ADN inmediatamente después de producidos. Este tipo de reparación no es muy común, ya que hay algunos daños en el ADN irreversibles. La fotorreactivación es el mecanismo de organismos procariotes mediante la enzima fotoliasa para reconocer los dímeros de pirimidinas producidos por la luz UV. Esta enzima se une al dímero de timina y utiliza la energía de la luz para romper los enlaces covalentes entre las pirimidinas, con lo que logra que vuelvan a formar complementariedad con la cadena antiparalela (figura 9-3). Otro tipo de enzimas que partici-

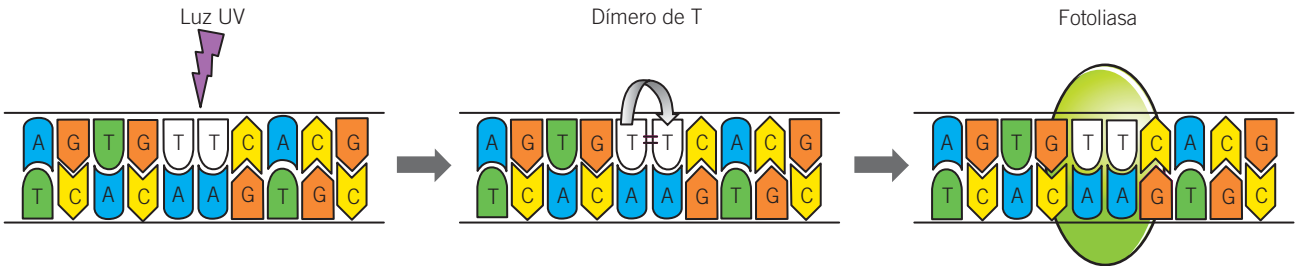


Figura 9-3. Reparación de dímeros de timina.

pan en este sistema de reparación son las alquiltransferasas, enzimas que eliminan los grupos alquilos de la guanina y restauran la estructura original, sin la necesidad de alterar el esqueleto del ADN.

Sistemas de reparación por escisión: reparación por escisión de bases y reparación por escisión de nucleótidos

Reparación por escisión de bases

El sistema de reparación por escisión de bases (*base excision repair*, BER) elimina del genoma las bases dañadas que se producen por alquilación, radiación ionizante, oxidación y desaminación. En este sistema intervienen las enzimas denominadas ADN glucosilasas, de las cuales existen por lo menos ocho tipos distintos específicos para cada lesión. La reparación se realiza hidrolizando el enlace glucosídico entre la base nitrogenada y el azúcar, con lo que se elimina la base dañada. Esta rotura genera sitios apurínicos o apirimidínicos reconocidos por una AP endonucleasa 1 (APE-1) que rompe el enlace fosfodiéster adyacente. Posteriormente, la ADN polimerasa β adiciona los nucleótidos para rellenar el hueco generado empleando la cadena que no está dañada como molde. El fragmento recién sintetizado forma el enlace fosfodiéster faltante para su ligación gracias a la ligasa (figura 9-4).

Reparación por escisión de nucleótidos

El sistema de reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*, NER) reconoce cualquier lesión que provoque una distorsión importante en la doble cadena del ADN. Implica en primer lugar el reconocimiento del daño en la secuencia del ADN; posteriormente, una endonucleasa hidroliza los enlaces fosfodiéster a cada lado y varios pares de bases de distancia de la lesión, y se elimina el fragmento de ADN de cadena sencilla que presenta la lesión. El hueco que se genera por la rotura se rellena con ayuda de la ADN polimerasa I y, por último, la ligasa sella la cadena que se sintetiza. Defectos en las proteínas de este sistema provocan el síndrome xeroderma pigmentosa (XP).

En *Escherichia coli* esta reparación la llevan a cabo cuatro proteínas: UvrA, UvrB, UvrC y UvrD (UV *resistant*). UvrA y UvrB se unen para formar un complejo que se encarga de reconocer las distorsiones en la cadena de ADN. Una vez que localizan el daño, UvrA se disocia del complejo; UvrB separa la doble cadena de ADN; a continuación, UvrC se une a UvrB, y el complejo corta a siete nucleótidos de

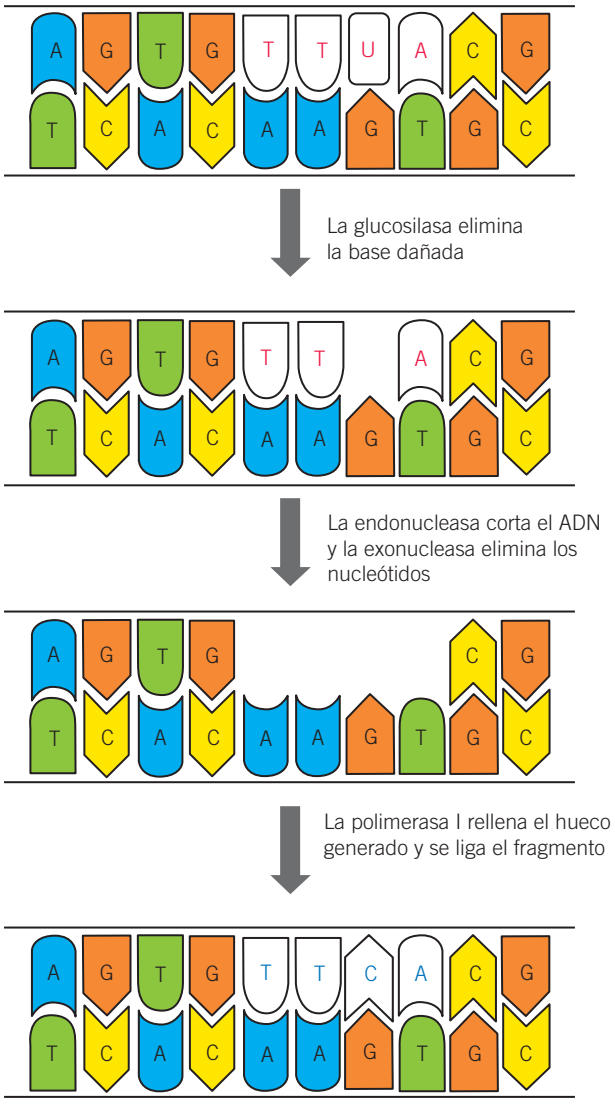


Figura 9-4. Reparación por escisión de bases.

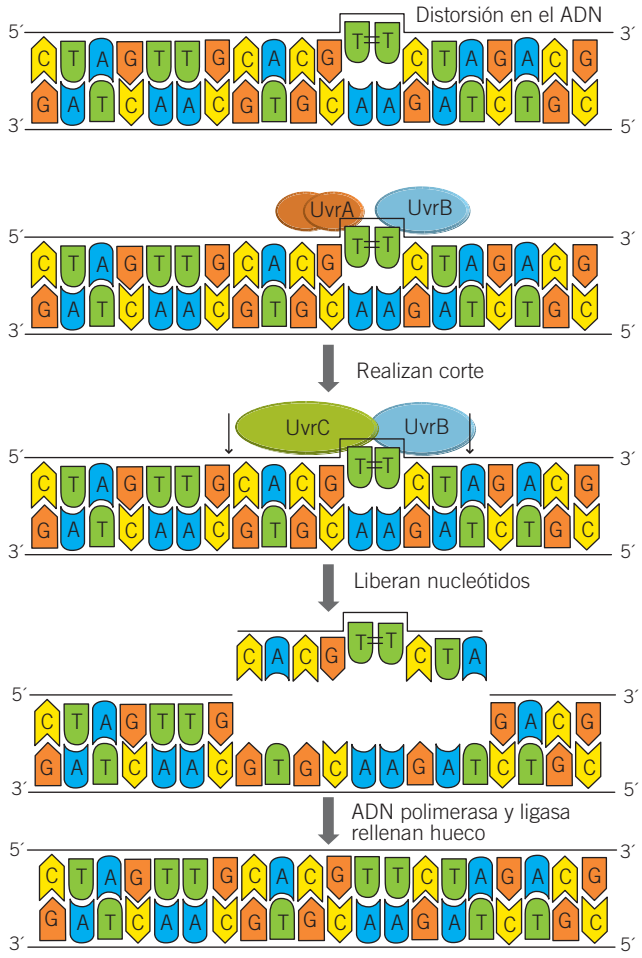


Figura 9-5. Reparación por escisión de nucleótidos.

distancia en dirección 5´ y cuatro en dirección 3' del sitio de la lesión. Posteriormente, UvrD, una helicasa, ayuda a liberar el fragmento y, por acción de la ADN polimerasa I y la ligasa, se rellena el hueco generado con el corte (figura 9-5).

Sistema 8-oxo guanina

La radiación UV, la radiación ionizante y algunos agentes químicos pueden provocar que las bases del ADN se oxiden. Una base muy susceptible de oxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS) es la guanina, que como consecuencia se transforma en 8-oxo guanina (GO) u 8-hidroxiguanina, que en lugar de unirse a la citosina se unirá a una adenina y producirá un par erróneo G-A. Este error ocasionará, después de la replicación, una sustitución de C por A en el genoma, error que si no se repara se transmitirá a la siguiente generación como un cambio permanente.

En humanos, una enzima llamada ADN OGG1 reconoce a la adenina unida con la GO, elimina la base incorrecta (adenina) y la sustituye por la citosina correcta (figura 9-6). Las enzimas participantes en este sistema en procariotes son mutM y mutY (*metil-directed mismatch repair*).

Figura 9-6. Sistema de reparación GO.

Sistema de reparación de los apareamientos erróneos

Este sistema se basa en la reparación de las bases mal apareadas y la corrección de los *bucles* que se producen en la cadena de ADN como consecuencia del deslizamiento de la polimerasa durante la replicación. El ejemplo más clásico de este sistema de reparación es el que utiliza *E. coli*, en el que participan tres proteínas: MutS, MutL y MutH. La proteína MutS reconoce las bases mal apareadas y se une a ellas; MutL permitirá que se forme el complejo de reparación y, a su vez, activará MutH, con actividad de endonucleasa; además producirá la rotura de la cadena donde se localiza la base mal apareada, y MutH tiene la capacidad de discriminar la cadena que se tiene que reparar por el fenómeno de hemimetilación. La enzima Dam metilasa *(ADN adenine methylation)* se encarga de la metilación de la secuencia 5´-GATC-3´ en las dos cadenas, por lo que después de que ocurra la replicación del ADN, la única cadena metilada será la parental, mientras que la cadena de nueva síntesis no estará metilada y se reconocerá como la cadena que se ha de reparar. Una vez que se elimina el segmento con la base mal apareada, la polimerasa III añade la base correcta (figura 9-7). Este sistema de reparación también puede encontrarse en células eucariotas, donde participan dos proteínas: la MSH y MLH, análogos de MutS y MutL, respectivamente. Un defecto en este sistema provoca inestabilidad cromosómica asociada a enfermedades como el cáncer de colon.

Sistema SOS

Este sistema responde a la acumulación de ADN de cadena sencilla cuando el proceso de replicación se bloquea. Está integrado por más de 40 genes, que son activados por la proteína RecA (*recombination protein A*) en procariotes. En ausencia de daño, los genes *SOS* (*save our soul*) se encuentran unidos a su represor LexA. El ADN de cadena sencilla es una señal de activación para la proteína RecA que se une al ADN de cadena sencilla (ADNss) e interactúa con el represor LexA, lo que facilita su autoproteólisis; esto induce la transcripción de los genes que contienen la caja SOS (figura 9-8). Con ello, aumentan los niveles de las proteínas lexA, recA, UvrA, UvrB y UvrD. Por tanto, el primer mecanismo de reparación que se activa en respuesta a SOS

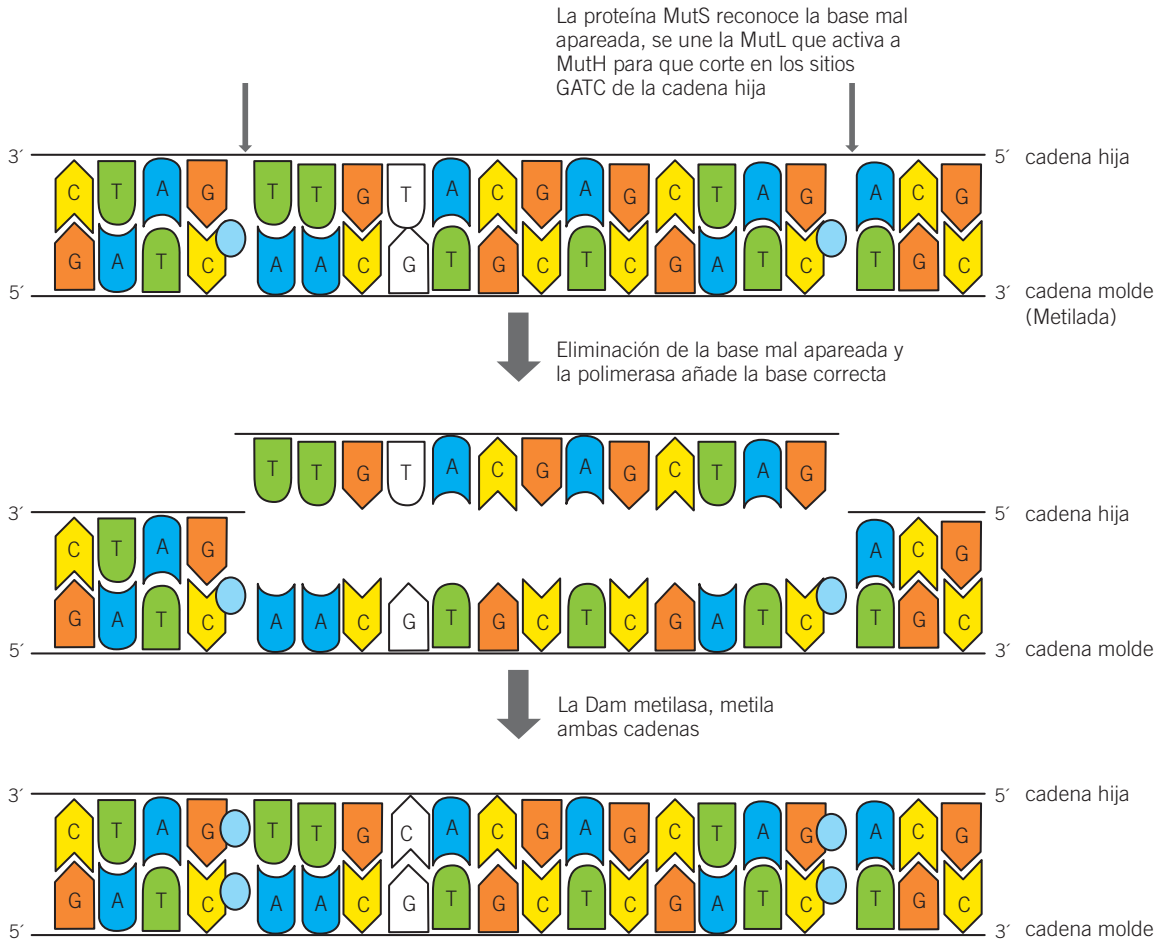


Figura 9-7. Reparación de los apareamientos erróneos.

es la reparación por escisión de nucleótidos (NER), que tratará de corregir el daño sin un encendido total de la vía SOS. Si el sistema NER no es suficiente para la reparación del ADN, las concentraciones de LexA disminuyen y se expresan genes como *sulA*, *umuD* y *umuC* (*UV-induced mutagenesis*). La proteína SulA se une a FtsZ (molécula indispensable para el inicio del ciclo celular) y detiene la división celular. Con ello, se induce al sistema de reparación UmuDC dependiente de mutagénicos.

Reparación de roturas de doble cadena

Reparación por recombinación homóloga

Es un sistema de reparación preciso que actúa durante la fase S del ciclo celular. Durante el proceso de replicación, este sistema se induce por la necesidad de tener una copia de ADN correcta que sirva como molde para restaurar la información perdida en la cadena dañada. En este sistema de reparación están involucrados los genes que pertenecen al grupo de epistasia de *RAD52 (radiation sensitive mutant 52)*, como *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59* y el complejo MRN formado por *MRE11 (meitoic recombination 11)*, *RAD50* y *NBS1 (Nijmegen breakage syndrome 1)*. Además, intervienen otros genes, como *BRCA1* y *BRCA2* (cáncer de mama 1 y 2). En humanos, *RAD51* desempeña un papel primordial en los mecanismos de recombinación homóloga para la reparación de roturas en la doble cadena del ADN. La recombinación homóloga implica gasto e hidrolisis de adenosín trifosfato (ATP) para el intercambio de la cadena de ADN, por secuencias homólogas. El primer paso para la reparación por recombinación homóloga involucra la activación del gen de la ataxia-telangiectasia mutado *(ataxia telangiectasia mutated,* ATM) que recluta el complejo MRN para que se una al ADN y, por su actividad de exonucleasa 5'-3', procesa los extremos donde ocurrió el daño dejando expuestos los extremos 3′ en forma de cadena sencilla. A continuación, la proteína de replicación A (RPA) se une al ADN de cadena sencilla e interactúa con *RAD52*; éste es desplazado por *BRCA2*, que atrae a *RAD51*. Por último, *RAD51* se une a la cadena sencilla y forma una nucleoproteína filamentosa con el ADN. Con ayuda de *RAD54* invade la hélice homóloga que sirve como molde para restaurar el fragmento dañado (figura 9-9). Alteraciones en las proteínas que participan en este sistema provo-

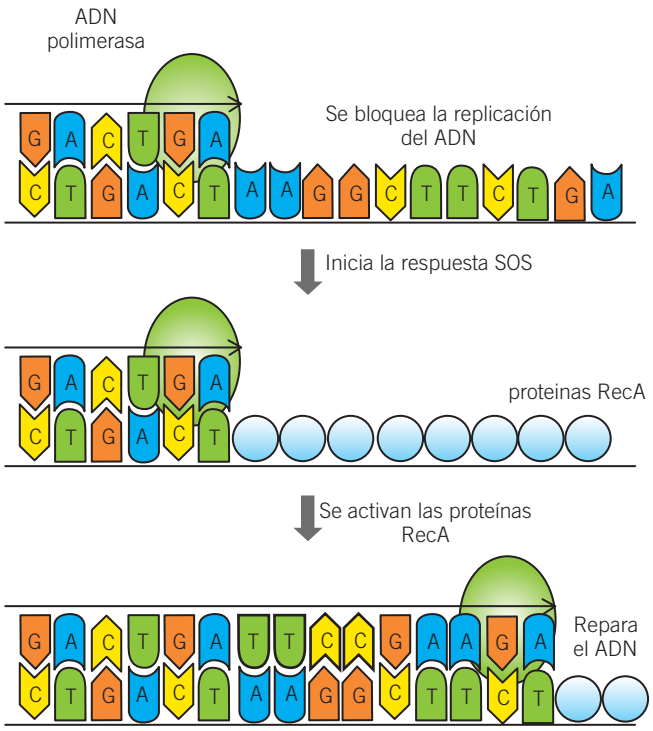


Figura 9-8. Sistema SOS.

can el síndrome de Bloom, la ataxia-telangiectasia y la anemia de Fanconi, que se describirán más adelante.

Unión de extremos no homólogos

Este sistema es uno de los que pueden participar cuando se producen roturas en la doble cadena de ADN. El componente principal de este sistema es la proteína de cinasa dependiente de ADN (ADN-PKcs), que consta de tres subunidades: KU70, KU80 y la subunidad catalítica ADN-PKcs. Estas subunidades reconocen los cortes en el ADN y mantienen los extremos en proximidad para su procesamiento y reunión. Para que se lleve a cabo el alineamiento de los extremos es necesario el complejo ARTEMIS/ADN-PKcs, con actividad de nucleasa y el complejo XRCC4/ligasaIV, que se encarga del paso final de la ligación (figura 9-10). Este proceso puede tener varios errores, ya que únicamente une los extremos rotos, lo que conlleva la pérdida de nucleótidos en el punto de unión. Este proceso se lleva a cabo principalmente en mamíferos; sin embargo, también se ha encontrado en algunas procariotas, lo que sugiere que está muy conservado evolutivamente.

Enfermedades humanas asociadas al funcionamiento de los sistemas de reparación

Muchas de las anomalías cromosómicas que generan enfermedades en la especie humana aumentan con la edad, pues los mecanismos de reparación tienden a fallar con más frecuencia. Sin embargo, también existen síndromes de inestabilidad cromosómica cuyo patrón de herencia es autosómico recesivo, caracterizados por una alta frecuencia de alteraciones cromosómicas en edades tempranas. Estas enfermedades implican defectos en los mecanismos de reparación del ADN. Los síndromes clásicos de inestabilidad cromosómica son: síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, ataxia-telangiectasia, xeroderma pigmentoso, los cuales presentan anormalidades estructurales de los cromosomas, como roturas, puentes intercromosómicos, tétradas, entre otras. La expresión clínica de cada una de estas entidades es variable y se observa un incremento en la frecuencia de neoplasias.

Síndrome de Bloom

Presenta características clínicas, como eritema telangiectásico en la cara, antebrazos y el dorso de las manos, fotosensibilidad, enanismo, manchas *café con leche*, alteraciones esqueléticas y neoplasias. A nivel celular se presentan intercambios entre cromátidas hermanas, roturas cromosómicas y reordenamientos. Las células son hipersensibles a la luz UV, la hidroxiurea (HU) y agentes alquilantes. El síndrome de Bloom lo causan mutaciones en el gen *BLM*, que codifica una proteína de la subfamilia RecQ de las ADN helicasas dependientes de ATP. Estas proteínas participan en la reparación, replicación y reparación por recombinación homóloga. BLM es un miembro del complejo BASC y contiene otros miembros que participan en los procesos de reparación, replicación y recombinación, como PCNA, RAD51, BRCA1, ATM y el complejo MRN. También actúa en la respuesta temprana al daño celular y promueve el posterior reclutamiento de proteínas de reparación en las horquillas de replicación.

Anemia de Fanconi

Es una enfermedad genética autosómica recesiva ligada al sexo, caracterizada por un conjunto de malformaciones congénitas, aplasia medular progresiva, con una prevalencia de 80%, y predisposición tumoral –más de 60% de los cánceres son hematológicos. Entre las alteraciones más frecuentes destacan la baja estatura, anomalías esqueléticas en antebrazos, dedos, cadera y rodillas, malformaciones renales y cardiacas, manchas *café con leche*, microcefalia, retraso mental leve e hipogonadismo en varones. La prevalencia de la anemia de Fanconi es de 1 a 5 nacimientos por cada millón de habitantes y se encuentra con una frecuencia de 0.3 a 1%, aunque estas cifras dependen del grupo étnico de que se trate así como del grado de consanguinidad.

La anemia de Fanconi es una enfermedad con heterogeneidad no sólo clínica sino también genética. Existen al menos 11 genes diferentes involucrados en la FA (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD* o *BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*,

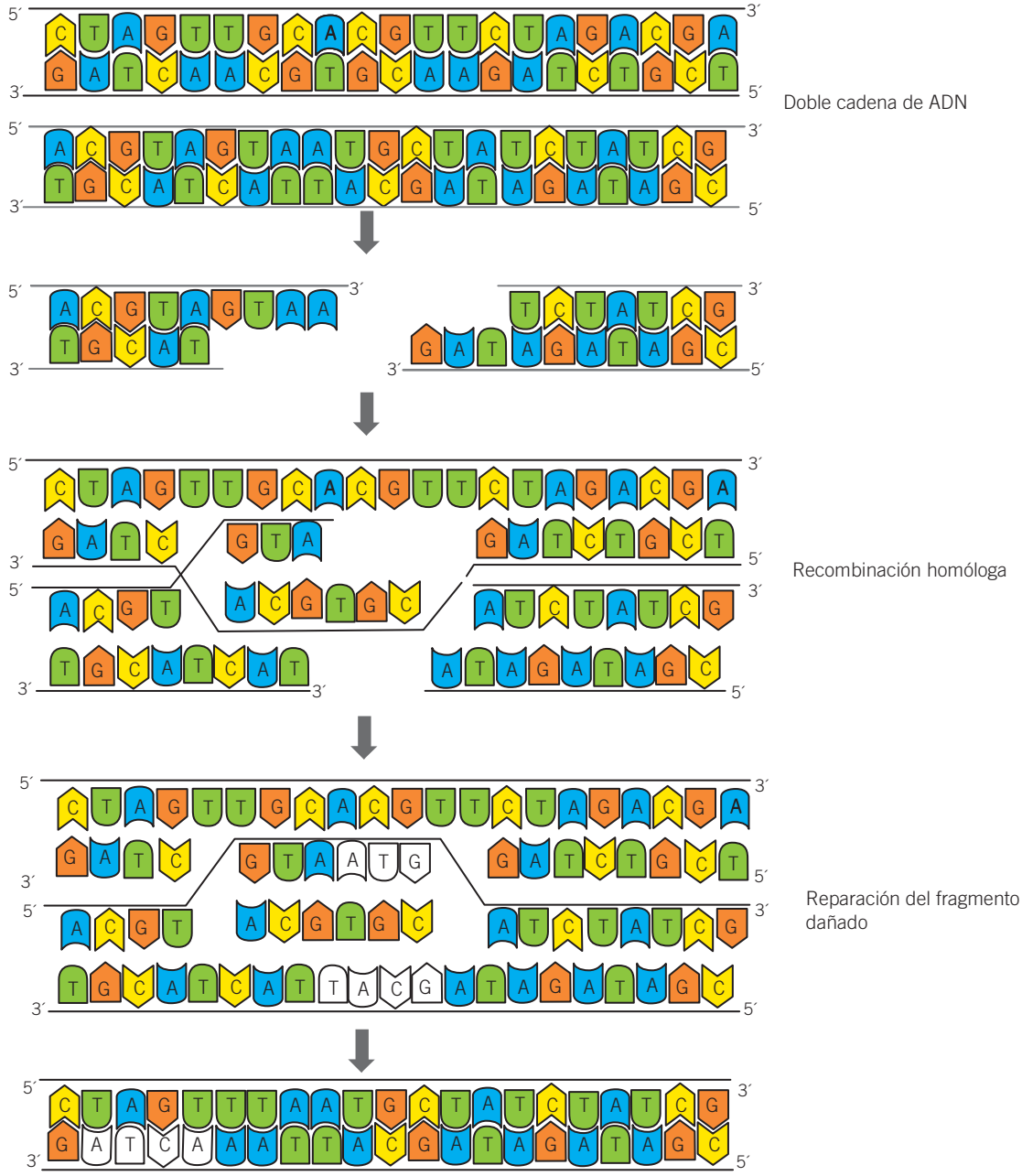


Figura 9-9. Reparación por recombinación homóloga.

FANCF, *FANCG*, *FANCI*, *FANCJ*, *FANCL*). Los defectos en cualquiera de los genes de anemia de Fanconi conllevan inestabilidad genómica y un riesgo elevado de presentar leucemias y carcinomas. El descubrimiento de *BRCA2* como uno de los genes de la anemia de Fanconi fortalece el papel de esta enfermedad en el procesamiento de roturas de doble cadena mediante recombinación homóloga.

Ataxia-telangiectasia

Es un síndrome genético con un complejo fenotipo clínico. Las principales características clínicas son degeneración neuronal progresiva, telangiectasia ocular, inmunodeficiencia, hipogonadismo, envejecimiento prematuro, inestabilidad genómica y predisposición al cáncer. A nivel celular, se presenta inestabilidad cromosómica, hipersensibilidad a las radiaciones, defectos en los puntos de control del ciclo celular, acortamiento telomérico y alto nivel de especies reactivas de oxígeno.

La ataxia-telangiectasia es causada por defectos en el gen supresor de tumor *ATM*. En respuesta a las roturas de doble cadena, *ATM* fosforila rápidamente una serie de proteínas involucradas en vías de señalización, como p53 o

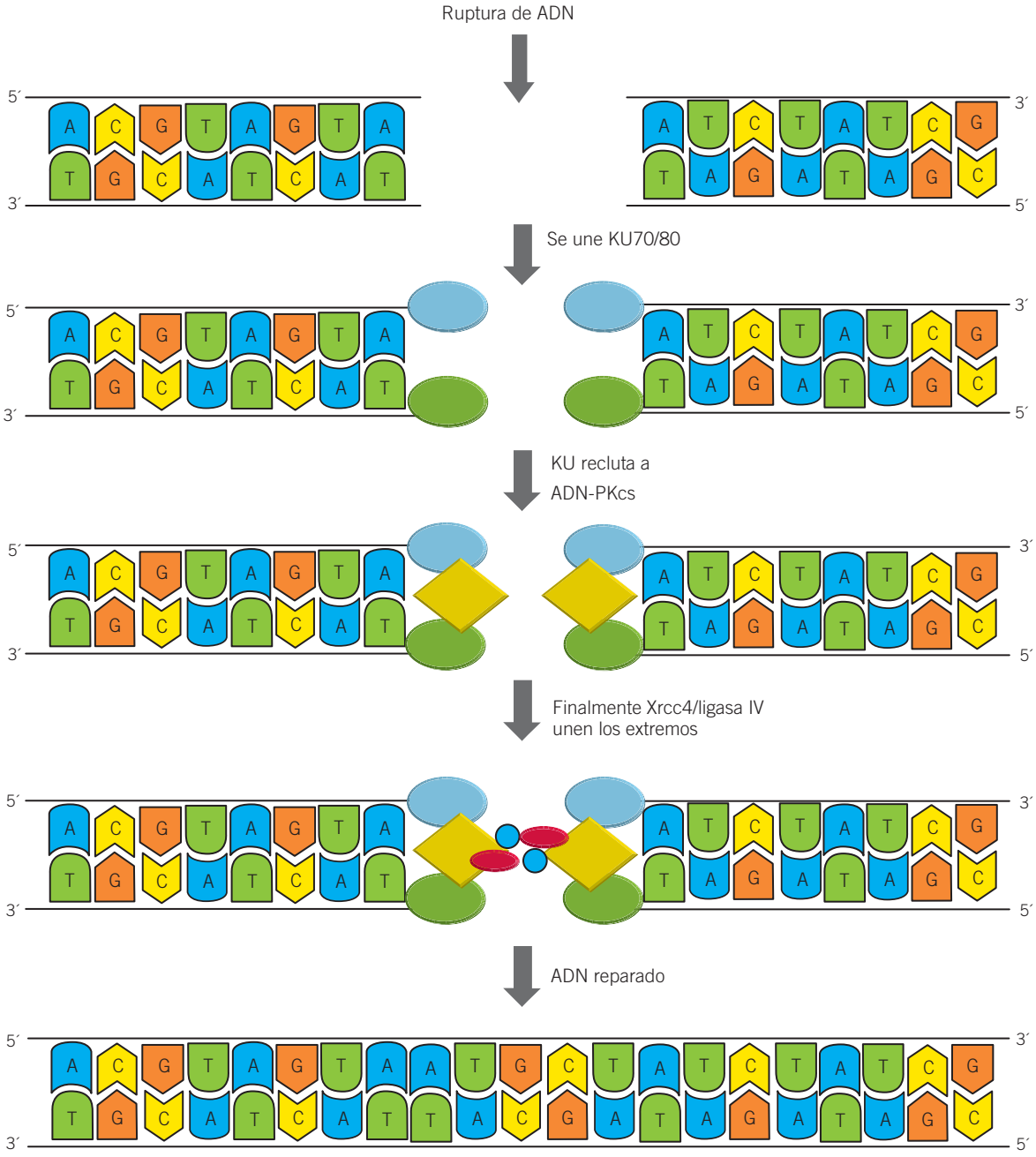


Figura 9-10. Unión de extremos no homólogos.

Mdm2, así como otras proteínas de reparación, como RAD50-MRE11-NBS1 y BRCA1, relacionadas con síndromes de inestabilidad cromosómica.

Xeroderma pigmentoso

Es una enfermedad cutánea multigénica caracterizada por una elevada sensibilidad a todas las fuentes de radiación UV. Las personas afectadas presentan envejecimiento prematuro, lesiones oculares, trastornos neurológicos y una elevada predisposición a desarrollar cáncer de piel. El xeroderma pigmentoso es causado por defectos en uno o varios de los ocho genes *XPA-XPG*, más una variante, *XPV*; por lo tanto, existen nueve subtipos clínicos de la enfermedad, que incluyen varias manifestaciones cutáneas y neurológicas. Estos genes codifican para las proteínas que participan en los mecanismos de reparación NER, por lo que las mutaciones en los genes *XPA-XPG* son las responsables de la inestabilidad genómica presente en los pacientes con xeroderma pigmentoso.

Ejercicios de integración

1. Relacione el sistema de reparación con el tipo de lesión que repara.

Sistema SOS	Roturas de doble cadena.
Reparación directa	Daños que involucran una sola base.
Reparación de apareamientos erróneos	Daños por acumulación de ADN de cadena sencilla.
Recombinación homóloga	Dímeros de timina.
Reparación por escisión de bases (BER)	Bases mal apareadas.

2. Mencione los agentes físicos y químicos que producen daños en el ADN.

3. Relacione el sistema de reparación con las enzimas que participan.

Sistema SOS	ADN glucosilasas
Reparación directa	Sistema UvrA, B, C, D
Reparación por escisión de nucleótidos (NER)	RAD51,-52-54, RPA, BRCA2
Recombinación homóloga	LexA y RecA
Reparación por escisión de bases (BER)	Fotolipasa

4. El xeroderma pigmentoso está causado por defectos en las proteínas que participan en el sistema de reparación:
- **a)** BER
- **b)** NER
- **c)** Sistema SOS
- **d)** Recombinación homóloga

5. Alteraciones en las proteínas que participan en el sistema por recombinación homóloga provocan:
- **a)** Síndrome de Bloom
- **b)** Síndrome de Down
- **c)** Xeroderma pigmentoso
- **d)** Ninguna de las anteriores

Bibliografía

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Biología molecular de la célula,* 4ª ed. Barcelona: Omega, 2004.

Griffiths A., Miller J., Suzuki D., Lewontin R., Gelbart W. *Genética,* 7ª ed. Madrid: McGraw-Hill, 2002.

Janion C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in Escherichia coli. *Int J Biol Sci,* 2008;4:338-344.

Lewin B. *Genes IX.* Sudbury: Jones & Bartlett Publishers, 2007.

Martín A.L. *Programa de actualización continua para médicos generales.* Academia Nacional de Medicina, 2ª ed. México, DF: Intersistemas, 1999.

Rastogi R.P., Richa, Kumar A., Tyagi M.B., Sinha R.P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids,* 2010;2010:592980.

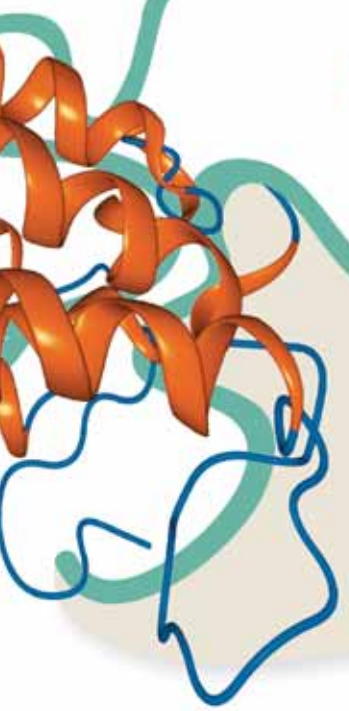
Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. *Biología molecular del gen,* 5ª ed. Madrid: Médica Panamericana, 2006.

Parte II

Metodología del ADN recombinante

Contenido

Capítulo 10 Manejo de muestras para estudios moleculares
Capítulo 11 Extracción de ácidos nucleicos
Capítulo 12 Electroforesis
Capítulo 13 Enzimas de restricción
Capítulo 14 Vectores de clonación y expresión
Capítulo 15 Técnicas de hibridación
Capítulo 16 Reacción en cadena de la polimerasa
Capítulo 17 Secuenciación de ácidos nucleicos y microarreglos
Capítulo 18 Polimorfismos y huellas de ADN



Capítulo 10

Manejo de muestras para estudios moleculares

Jesús Javier García Bañuelos / Blanca Estela Bastidas Ramírez
Elizabeth Gordillo Bastidas / Daniela Gordillo Bastidas

Introducción

Los estudios de biología molecular o tecnología del ADN recombinante incluyen los análisis en que el material de interés son los ácidos nucleicos: ADN y ARN. El conocimiento de las características y propiedades de estas dos biomoléculas ha permitido la implementación de técnicas utilizadas en investigación y en la práctica médica. Estas metodologías se aplican con diversos fines, como la identificación de individuos, el monitoreo de tratamientos, el establecimiento de diagnósticos, la detección de bacterias y virus, la determinación de carga viral, y el estudio de mutaciones y polimorfismos génicos, entre otros.

El análisis molecular constituye una herramienta indispensable en el área de ciencias de la salud y establece diagnósticos, pronósticos y tratamientos certeros, específicos y actuales. Asimismo, estos análisis permiten profundizar en el conocimiento de los mecanismos normales y las alteraciones de los procesos celulares que participan en el desarrollo de una enfermedad, así como proponer nuevas alternativas terapéuticas y preventivas.

Este capítulo pretende brindar al lector un panorama general de los lineamientos básicos para el manejo de muestras biológicas que serán sometidas a estudios moleculares. Se explica cómo seleccionar, obtener y preservar la muestra para obtener resultados fidedignos. Además, se mencionan algunos ejemplos específicos y las áreas de aplicación del análisis molecular.

Manejo de muestras

La implementación y realización de las técnicas moleculares debe llevarse a cabo por personal altamente capacitado en el área de biología molecular. Sin embargo, los resultados que se obtengan no sólo dependerán de la prueba molecular que se emplee, sino también de la toma y conservación de la muestra de manera apropiada. De este modo, la metodología utilizada, bien sea simple o sofisticada, económica o costosa, no será confiable si no se parte de una muestra manejada de forma adecuada. En general el personal encargado de la toma, el transporte y del procesamiento de la muestra no es el mismo, por lo que es importante que cada uno de los implicados en el proceso conozca los cuidados y las consideraciones necesarios para evitar resultados erróneos. El manejo de muestras implica tres pasos fundamentales: selección, toma y preservación de la muestra.

Selección de la muestra: ¿qué muestra debo estudiar?

Debe elegirse la muestra que contenga el ácido nucleico de interés. De aquí surgen dos alternativas: estudio de ácidos nucleicos del individuo o detección de ácidos nucleicos exógenos. En la figura 10-1 se señalan algunos casos en los que pueden aplicarse los análisis moleculares y el tipo de muestra adecuado para tal fin.

Estudio de ácidos nucleicos de un individuo

En un individuo se puede estudiar su estructura genómica (ADN) o la expresión de sus genes (ARN) en una situación u órgano específicos.

Análisis de la estructura genómica de un individuo

Para este tipo de estudios la molécula de interés es el ADN genómico que se encuentra en el núcleo de las células. Todas las células de un individuo poseen el mismo genoma, que no se ve afectado por la edad ni por variables metabólicas. Por ello, la muestra para estudiar la estructura genómica de un individuo puede ser cualquier célula nucleada. Sin embargo, hay que elegir la muestra que involucre el procedimiento menos invasivo y la menor cantidad de riesgos e incomodidad para el paciente.

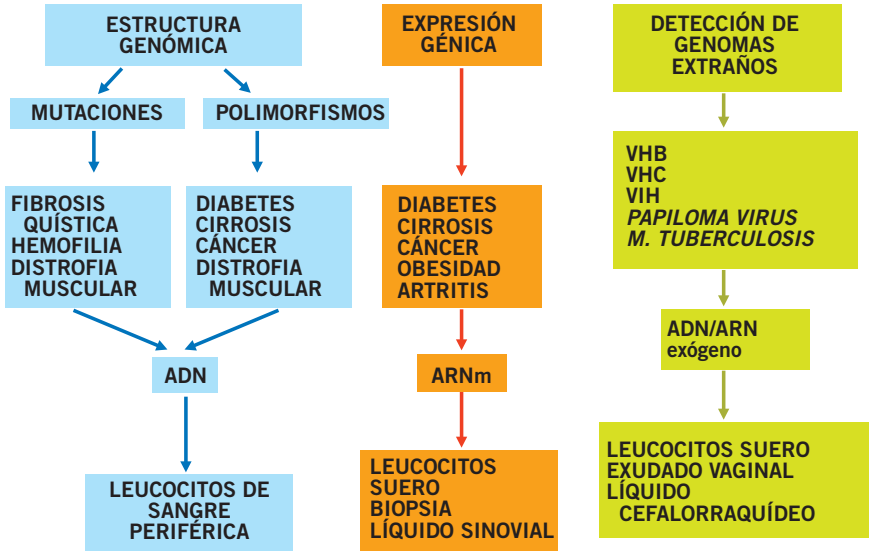


Figura 10-1. Selección de muestras para estudios moleculares.

La muestra de elección para el análisis de la estructura genómica de un individuo es sangre periférica con anticoagulante; ésta contiene glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. Las únicas células de este tejido que poseen núcleo, y por ende ADN, son los leucocitos, a partir de los cuales es posible extraer ADN genómico.

El análisis del ADN de una persona es importante, ya que permite identificar individuos, detectar polimorfismos génicos de predisposición o protección a ciertas enfermedades, analizar mutaciones y establecer el diagnóstico de enfermedades genéticas.

Estudio de la expresión génica de un individuo

Para este análisis la molécula de interés es ARN mensajero (ARNm). El estudio de la expresión génica de un individuo revelará los cambios bioquímicos que experimenta el organismo en respuesta a una situación particular o momento metabólico. La expresión génica se regula de manera espacial y temporal, y la regulación espacial representa la base de la diferenciación celular. Esto significa que los genes no se expresan en todos los tejidos, sino que cada tejido u órgano expresa solamente los genes necesarios para llevar a cabo su función; por ejemplo, la insulina se expresa en las células beta del páncreas, la albúmina en los hepatocitos, la mielina en las células de Schwann del sistema nervioso central, etc. Por otro lado, la regulación temporal significa que la expresión génica depende del momento metabólico en el que se encuentre el individuo: en un individuo sano o enfermo, en estado de ayuno o posprandial, en un embrión o en un anciano, o en estado de euforia o tristeza. Por esto, el individuo, como tal, es el resultado de la expresión de sus genes en un momento determinado. Estudiar la expresión génica resulta elemental en investigación para evaluar la respuesta a una variable específica y contribuir al conocimiento de la fisiología y patología humanas. Sin embargo, en la práctica médica, el estudio de la expresión de genes es complejo, y aún no supone una herramienta de diagnóstico de uso común, al alcance de todos, que brinde resultados que dicten o modifiquen estrategias de tratamiento clínico de manera significativa.

La muestra de elección dependerá del tejido donde se exprese el gen de interés: si se expresa en leucocitos, la muestra será sangre periférica con anticoagulante; si lo hace en el hígado, una biopsia de hígado, y si se expresa en tejido tumoral, una biopsia del tejido sospechoso; por ejemplo, si se desea conocer qué tanto se expresa el gen de la telomerasa en un tumor de cáncer de pulmón, la muestra indicada será la biopsia del tumor.

Detección de ácidos nucleicos exógenos

ADN exógenos

Las técnicas de biología molecular permiten la detección del ADN procedente de cualquier fuente ajena al paciente, como bacterias y virus de ADN, por lo que constituyen una herramienta útil para el diagnóstico molecular de enfermedades causadas por microorganismos. *Mycobacterium tuberculosis* es un buen ejemplo, ya que es una bacteria de crecimiento lento cuyo diagnóstico mediante cultivo microbiológico puede requerir hasta cinco semanas; mientras que las técnicas moleculares permiten su detección en 24 a 48 horas. Sin embargo, para la identificación de otros microorganismos, el cultivo microbiológico es una herramienta económica, sensible, rápida y específica. Por tal motivo, es recomendable que los estudios moleculares no se apliquen en forma indiscriminada.

Para la detección de genomas exógenos, la muestra dependerá de la historia natural del microorganismo infectante; por ejemplo, en la detección del virus de la hepatitis B

(VHB), se sabe que éste es un virus hepatotrófico que al replicarse produce lisis celular y que los virus se diseminan por todo el organismo a través del torrente sanguíneo; por ello, la muestra de elección es sangre periférica sin anticoagulante para la obtención de suero mediante centrifugación.

ARN exógenos

La detección de ARN exógeno a través de estudios moleculares es una práctica continua en investigación, y en algunos casos específicos de aplicación clínica. Por ejemplo, la detección y la cuantificación del ARN del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del virus de la hepatitis C (VHC) mediante estudios moleculares suponen una herramienta elemental en el monitoreo de su tratamiento.

La muestra de elección dependerá, al igual que en la determinación de ADN, de la historia natural de la partícula viral infectante. Tanto en el caso del VIH como en el del VHC, su historia natural permite establecer que el espécimen adecuado es suero procedente de una muestra de sangre periférica sin anticoagulante.

Toma de la muestra: ¿cómo debe tomarse la muestra?

En la toma de muestras para estudios moleculares deben considerarse algunos factores y recomendaciones que se mencionan a continuación. Si la muestra es sangre periférica, no es indispensable el estado de ayuno, ya que la ingesta de alimento no modifica la concentración ni la estructura de los ácidos nucleicos; sin embargo, es recomendable el ayuno para evitar que la alta concentración de lípidos de la muestra interfiera con la extracción de los ácidos nucleicos.

Uso de material libre de nucleasas

Las nucleasas (ADNsas y ARNsas) son enzimas altamente estables que degradan ARN, por lo que es necesario que se garantice la ausencia de estas enzimas en el material que se destine para análisis molecular, como lo son puntas y tubos de plástico, que deben ser nuevos, estériles y desechables. El material de vidrio y de metal puede someterse a temperatura de 230°C durante 8 horas para inactivar nucleasas.

Uso de guantes y cubrebocas

Las ADNsas y ARNsas se encuentran en la saliva y en el sudor, por lo que es obligatorio usar guantes y cubrebocas y su cambio frecuente cuando se trabaja con ácidos nucleicos.

Limpieza total

Las bacterias, los hongos y las células muertas de la piel son fuentes ricas en ARNsas, por lo que se recomienda tomar las muestras en un ambiente higiénico, limpiar las superficies de trabajo con agentes descontaminantes y utilizar inhibidores de ARNsas, como el fenol, el dietilpirocarbonato de sodio (DEPC) u otros agentes ofrecidos por diversas casas comerciales.

Anticoagulantes

Se dispone de diversas sustancias que inhiben la cascada de la coagulación y que se utilizan en la toma de muestras. El ácido etilendiaminotetracético (EDTA) es un quelante de calcio y es el anticoagulante empleado con más frecuencia. Otro anticoagulante muy común es el citrato de sodio. Ambos pueden utilizarse para toma de muestras de sangre que se someterán a estudios moleculares. No se recomienda el uso de heparina, ya que puede interferir en procedimientos posteriores, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

ADN o ARN de glóbulos blancos

Para aislar ADN o ARN a partir de glóbulos blancos, debe tomarse una muestra de sangre periférica en un tubo nuevo, estéril con anticoagulante, EDTA o citrato de sodio. La cantidad de sangre dependerá del método de extracción de ácidos nucleicos que vaya a emplearse y de la cantidad de éstos que se requiera. Para la obtención de ADN, las muestras pueden guardarse a 4°C hasta por cinco días sin que afecte de manera significativa a la cantidad de ADN . Para la obtención de ARN el procesamiento debe ser, de preferencia, de inmediato, para evitar la degradación por ARNsas.

ADN o ARN de suero

Se toman 3 ml de sangre periférica en un tubo seco. Se deja a temperatura ambiente el tiempo mínimo necesario para permitir la formación del coágulo (máximo, 20 minutos). Enseguida, la muestra se centrifuga a 3 000 rpm durante 10 minutos; se separa el suero, y se transfiere a un tubo nuevo y estéril. El suero se somete al proceso de extracción de ácidos nucleicos adecuado, o bien se almacena a –20°C hasta su procesamiento. El paquete globular se desecha de acuerdo con las normas sanitarias de seguridad para desechos de material biológico contaminante.

ADN o ARN de biopsias

La expresión génica constituye el fundamento de la diferenciación celular, por lo que el estudio de la expresión génica de un individuo involucra la toma de una biopsia del tejido de interés. También puede realizarse la búsqueda de ácidos nucleicos exógenos en un tejido específico. La toma de biopsia no es un procedimiento simple sistemático, sino que debe realizarlo personal médico experto. Es un método invasivo que representa un riesgo para el paciente y requiere del uso de equipos costosos; por ejemplo, en el caso de infección por el VHB en estadio no replicativo, una biopsia hepática podría servir tanto para evaluar el grado del daño hepático mediante el estudio de la expresión de colágena (ARN del huésped), como para llevar a cabo la bús-

queda del virus (ADN viral). La toma de la biopsia hepática debe dirigirse con un equipo de ultrasonido, y el paciente debe permanecer en reposo total después del procedimiento, oprimiendo el sitio de la punción durante por lo menos 12 horas para evitar hemorragias y complicaciones.

Otros fluidos biológicos

En el caso de orina, líquido cefalorraquídeo o líquidos de punción, es necesario tomar la muestra en recipientes nuevos, estériles, con las precauciones de limpieza y esterilidad indicadas en este capítulo.

Preservación. ¿Qué variables afectan la estabilidad de los ácidos nucleicos?

Los ácidos nucleicos son susceptibles de degradarse por las nucleasas existentes en todas las células. La preservación de los ácidos nucleicos está dirigida a la inactivación de nucleasas, por lo que las principales variables que afectan la integridad del ADN y el ARN aislados o dentro de las muestras son la temperatura y el tiempo. Debido a las características fisicoquímicas y estructurales de los ácidos nucleicos, el ARN es una molécula mucho más sensible a la acción de nucleasas que el ADN, por lo que los cuidados para su preservación suelen ser más estrictos. El ADN aislado puede mantenerse viable a 4°C durante varias semanas, a –20°C durante varios meses y a –70°C durante años. Pueden utilizarse inhibidores de ADNsas, cuando el ADN sea la molécula en estudio, o bien inhibidores de ARNsas, cuando se tenga interés en estudiar ARN. Una recomendación valiosa es colocar la muestra desde el momento de la toma en varias alícuotas para evitar congelamientos y descongelamientos repetidos que favorezcan la degradación de los ácidos nucleicos.

Biopsias

Como ya se explicó, las biopsias se emplean generalmente para estudiar la expresión génica, es decir, ARN; aunque también puede extraerse ADN exógeno o del paciente. Sin embargo, los cuidados en el manejo de las biopsias están dirigidos principalmente a la preservación de ARN por ser una molécula fácilmente degradable. Los tejidos contienen ARNsas endógenas que pueden inactivarse a baja temperatura. Se recomienda el uso de nitrógeno líquido para congelar el tejido inmediatamente después de su recolección, ya que su temperatura se encuentra por debajo de los –196°C, y transportarlo en él hasta el sitio donde se almacenará o procesará para la extracción de ácidos nucleicos. Sin embargo, la congelación con nitrógeno líquido no siempre es una opción viable, y existen algunas soluciones en el mercado para preservar la integridad del ARN en tejidos, almacenando la muestra a 4°C hasta por un mes antes de aislar el ARN. Finalmente, las biopsias pueden mantenerse dentro de un ultracongelador a –70°C, o bien en nitrógeno líquido por tiempo indefinido antes de la extracción de ácidos nucleicos.

Fluidos biológicos

Siempre que la molécula de interés sea ARN, las muestras deben mantenerse a –70°C o en nitrógeno líquido, hasta que se lleve a cabo la extracción de ARN.

ADN de leucocitos

Las muestras de sangre para obtención de leucocitos y la posterior extracción de ADN pueden mantenerse a temperatura ambiente entre 15°C y 25°C, hasta por 48 horas; a 4°C por varios días, o indefinidamente a –70°C. Sin embargo, para garantizar la obtención de ADN en buena cantidad y de buena calidad utilizando métodos económicos de extracción, debe llevarse a cabo la extracción lo más pronto posible.

ARN o ADN en suero

El suero debe mantenerse a –70°C o en nitrógeno líquido.

Uso de métodos comerciales

En la actualidad, el desarrollo de la biología molecular y la ingeniería genética han permitido el diseño de moléculas o sustancias que preservan la integridad de los ácidos nucleicos manteniendo las muestras a –20°C, 4°C y aun a temperatura ambiente. Asimismo, se dispone de métodos comerciales para la extracción de ácidos nucleicos de muestras no frescas, que ofrecen un rendimiento aceptable a partir de muestras no almacenadas de manera adecuada. Obviamente esta diferencia en el rendimiento se refleja también en el costo, ya que un método casero de extracción de ácidos nucleicos podrá tener un costo 100 veces menor que uno comercial. La cuidadosa preservación de las muestras garantizará resultados fidedignos y la disponibilidad de ADN o ARN para llevar a cabo ensayos por triplicado y asegurar resultados libres de errores, al ofrecer una cantidad y una calidad de ácidos nucleicos buenas en la muestra, aun utilizando métodos económicos y sencillos de extracción.

Contaminación de muestras y degradación

Pueden obtenerse resultados no fidedignos cuando las muestras no se procesan o conservan de forma adecuada (figura 10-2), denominados *falsos positivos* y *falsos negativos*.

Resultados falsos positivos

Un resultado falso positivo se obtiene cuando una muestra se contamina con otra, debido a un procesamiento inadecuado y da como resultado la detección de ADN o de ARN ajeno a la muestra problema.

Resultados falsos negativos

Un resultado falso negativo surge cuando el ADN o el ARN presentes en una muestra se degradan por acción de las nucleasas, lo que los convierte en indetectables a la sensibilidad del método molecular utilizado.

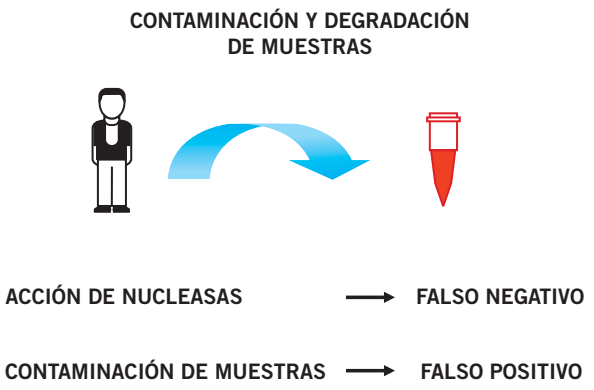


Figura 10-2. Contaminación y degradación de muestras.

Trastornos o agentes infecciosos detectados por estudios moleculares

a) Agentes infecciosos: VIH, VHB, VHC, virus del papiloma humano (VPH), *Mycobacterium tuberculosis*, genotipos del VHB, etcétera.
b) Enfermedades genéticas: fibrosis quística, distrofia muscular de Duchenne, anemia de células falciformes, etcétera.
c) Polimorfismos génicos de predisposición o protección a enfermedades: apolipoproteína E en la enfermedad de Alzheimer, receptor β-3-adrenérgico en artritis reumatoide, cyp2E1 en cirrosis, etcétera.
d) Enfermedades adquiridas, expresión de genes: ARNm de albúmina en cirrosis, ARNm de ApoA1 en enfermedad hepática, diabetes mellitus tipo 2, ARNm de albúmina en cirrosis, etcétera.

Áreas de aplicación de los estudios moleculares

Los estudios moleculares tienen utilidad en todas las áreas de las ciencias biológicas. A continuación se mencionan algunas de las disciplinas correspondientes a las ciencias de la salud:

a) Infectología: los estudios moleculares se utilizan ampliamente en la identificación de virus y bacterias, por sus elevadas sensibilidad, especificidad y rapidez.
b) Epidemiología: la detección de polimorfismos génicos de susceptibilidad o protección en una población mediante estudios moleculares es de gran utilidad para la implementación de campañas de prevención. Asimismo, los estudios moleculares han permitido la identificación de genotipos de microorganismos endémicos de una región para establecer tratamientos específicos.
c) Nutrigenómica y nutrigenética: el análisis molecular permite evaluar la interacción de los genes y los nutrimentos para la preservación y mejoramiento de la salud.
d) Farmacología: el conocimiento de los procesos fisiológicos y patológicos moleculares ha contribuido al diseño de nuevos fármacos, con mayor especificidad y menor cantidad de efectos colaterales.
e) Terapia génica: los procedimientos moleculares han hecho posible el surgimiento de nuevas alternativas de tratamiento a padecimientos genéticos o adquiridos incurables.

Ejercicios de integración

1. Describa en los recuadros el tipo de muestra de elección según la clasificación del material genético, indicando los cuidados especiales que requiere dicha muestra para obtener un resultado confiable en los análisis de biología molecular.

Material genético	Tipo de muestras posibles	Cuidados especiales
ADN exógeno		
ARN exógeno		
ADN endógeno		
ARN endógeno		

2. Describa en los recuadros de la tabla, de acuerdo con la afección que se necesita diagnosticar, el tipo de muestra que debe seleccionarse y el tipo de ácido nucleico que debe analizarse.

Enfermedad	Muestra biológica	Ácido nucleico
Tuberculosis		
VIH		
VHB		
Hemofilia		
Cirrosis hepática		

Preguntas de repaso

a) Enliste las aplicaciones del estudio de la estructura genómica de un individuo.
b) Mencione un ejemplo donde se aplique el estudio de la expresión génica de un individuo.
c) Señale tres recomendaciones para la toma y preservación de muestras para estudios moleculares.
d) Explique la diferencia entre un resultado falso negativo y un resultado falso positivo.
e) ¿Qué tipo de muestra emplearía para detectar una mutación?

Bibliografía

Beutler E., Gelbart T., Kuhl W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 1990;9:166.

Cohen C.D., Frach K., Schlöndorff D., Kretzler M. Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: *A novel protocol for a high-throughput multicenter application.* Kidney Int, 2002;61:133-140.

Guio H., Okayama H., Ashino Y., Saitoh H., Xiao P., Miki M., *et al.* Method for efficient storage and transportation of sputum specimens for molecular testing of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006;10:906–910.

Holland N.T., Pfleger L., Berger E., Ho A., Bastaki M. Molecular epidemiology biomarkers - Sample collection and processing considerations. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005;206:261-268.

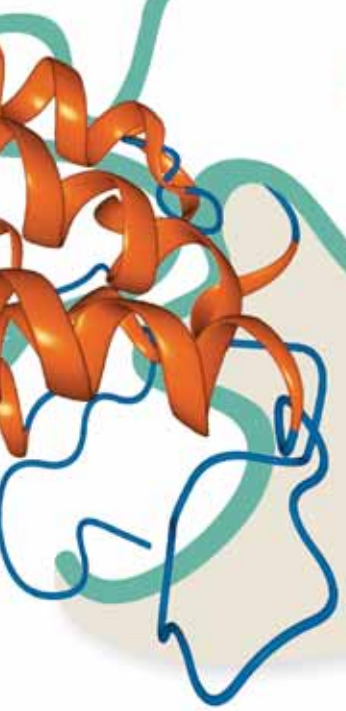
Holland N.T., Smith M.T., Eskenazi B., Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res*, 2003;543:217-234.

Marteau J.B., Mohr S., Michele Pfister M., Visvikis-Siest S. Collection and storage of human blood cells for mRNA expression profiling: A 15-month stability study. *Clin Chem*, 2005;51:1250-1252.

Rockey D.C., Caldwell S.H., Goodman Z.D., Nelson R.C., Smith A.D. Liver biopsy. *Hepatology*, 2009;49:1017-1044.

Sambrook J., Russel D.W. *Molecular cloning*, 3ª ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001;1:6-8.

Vaught J.B. Blood collection, shipment, processing, and storage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006;15:1582-1584.



Capítulo 11

Extracción de ácidos nucleicos

Ana Soledad Sandoval Rodríguez / Abril Bernardette Martínez Rizo
David Alejandro López de de la Mora

Introducción

Los ácidos nucleicos, el ADN y ARN reciben su nombre del hecho de ser moléculas con características acídicas (como la carga negativa en soluciones acuosas) y haberse localizado inicialmente en el núcleo celular, aunque ahora se sabe que también se encuentran en la mitocondria. Para su estudio los ácidos nucleicos deben aislarse del resto de los componentes celulares, como lípidos y proteínas, más abundantes que los ácidos nucleicos. Asimismo, dependiendo del objeto de estudio debe aislarse de preferencia el ADN o ARN; así, para estudios de niveles de expresión génica se extraerá ARN, mientras que para la búsqueda de modificaciones o alteraciones génicas, ADN.

Consideraciones para la extracción de ácidos nucleicos

La molécula de ADN con independencia de la estabilidad química dada por su estructura helicoidal, es físicamente frágil, por ser larga, tortuosa y con un peso molecular alto, lo que provoca que se someta a fuerzas hidrodinámicas que la disgregan. En solución, el ADN de doble cadena (ADNds) se comporta como una estructura rígida enrollada de forma aleatoria, regida por las repulsiones electrostáticas de las pares de bases y el esqueleto de fosfatos cargados negativamente. Al pipetear, agitar o revolver el ADN se genera un flujo hidrodinámico que puede separar las dos cadenas de ADN; entre más larga la molécula, más débil la fuerza requerida para esta rotura. Por ello, obtener fragmentos de ADN genómico es fácil, pero conforme se requieran tamaños moleculares elevados (> 150 kb) la técnica se dificulta. Los fragmentos deADN generalmente obtenidos por las técnicas de extracción deADN oscilan entre 100 y 150 kb y son adecuados para Southern blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis y construcción de bibliotecas genómicas.

Elección del método de extracción

La extracción de ácidos nucleicos es el primer paso para la mayoría de los estudios en biología molecular y para las técnicas del ADN recombinante. En la actualidad, se dispone de múltiples metodologías de extracción, lo que permite que los biólogos moleculares puedan seleccionar la técnica que más se ajuste a sus necesidades. La elección del método de extracción suele realizarse en función de los siguientes criterios:

- Tipo de ácido nucleico que se va a extraer: ADN de cadena sencilla (ADNss), DNAds, ARN total, ARN mensajero (ARNm) o ARN ribosomal (ARNr).
- Organismo origen del ácido nucleico: mamíferos, plantas, procariotes o virus.
- Fuente del ácido nucleico: cultivo celular, tejido (generalmente biopsia), sangre (leucocitos), expectoración, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, etcétera.
- Técnica en que se utilizará el ácido nucleico extraído: según el uso que vaya a tener el ácido nucleico los requerimientos de rendimiento, pureza y tiempo de extracción variarán acorde a la metodología que se vaya a aplicar, como retrotranscripción, PCR, clonación, Northern blot, Southern blot, etcétera).

En el área médica, el ADN genómico suele extraerse para su uso en procesos como una PCR cualitativa o Southern blot, para diagnóstico, determinación de variantes alélicas o clonación en vectores. En cambio, el ARN se extrae para realizar una reacción de retrotranscripción y, posteriormente, una PCR que determine los niveles de expresión génica en condiciones y momentos determinados. El ADN mitocondrial, por su parte, se extrae para diag-

nóstico de enfermedades mitocondriales o bien análisis evolutivo; pero el aislamiento de este ADN conlleva un proceso específico.

Fuente del ácido nucleico

En teoría el ADN/ARN puede obtenerse de cualquier célula/virus que lo contenga; solamente los eritrocitos no se consideran una fuente de ADN/ARN, ya que son anucleados. Las fuentes posibles de material para la extracción de los ácidos nucleicos son: leucocitos (sangre), suero, plasma, biopsia, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido anmiótico, esputo, semen, raspado bucal, folículo capilar, etc. Por acuerdos éticos, se prefieren las muestras no invasivas frente a cualquier tipo de biospia o toma invasiva de líquido. En el cuadro 11-1 se ejemplifica el ácido nucleico adecuado, así como la muestra de elección según el tipo de enfermedad que se desee diagnosticar.

Con independencia del tipo de muestra utilizada para la extracción, es una técnica minuciosa, que involucra lisis de la célula, separación, purificación, precipitación, lavado y disolución. Durante la extracción de ácidos nucleicos, y en particular en la extracción del ARN, que es una molécula más lábil ya que es de cadena sencilla, debe considerarse el uso de material nuevo, estéril, libre de ADNsas y ARNsas, y el uso de guantes para impedir la degradación de la muestra con nucleasas provenientes del ambiente (pelo, sudor, saliva, polvo), así como para impedir cualquier contaminación con ácidos nucleicos exógenos. Todo el proceso debe realizarse en frío; esto es, con los reactivos y las muestras a 4°C antes y durante el proceso, conservando la muestra congelada hasta justo antes de iniciar la extracción.

Extracción de ADN

Las técnicas comunes de extracción de ácidos nucleicos son muy diversas e incluyen procesamientos químicos y físicos que las diferencian; cada una presenta ventajas y desventajas, que se agrupan en el cuadro 11-2.

Extracción de ADN por la técnica fenol-cloroformo

Esta técnica se fundamenta en la lisis total de las células y sus estructuras subcelulares mediante el empleo de detergentes con la posterior eliminación de las proteínas mediante su extracción y la de componentes lipídicos con solventes orgánicos. Esto deja al *ADN puro* listo para su separación por precipitación en soluciones alcohólicas. Es la técnica más empleada, por la cantidad y la calidad del ADN obteni-

Cuadro 11-1. Selección del ácido nucleico a extraer. Se marca con una "X" la elección recomendada del ácido nucleico y fuente del mismo según la enfermedad de interés. Las patologías se han agrupado en alteraciones genéticas, enfermedades multifactoriales y enfermedades adquiridas o infecciosas.

Selección de tipo de muestra		Leucocitos		Biopsia		Suero, plasma		Mucosa bucal	Suero, biopsia	Suero, biopsia	LCR, suero, biopsia, orina, expectoración
		ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ADN oral	ARN viral	ADN bacteriano
Alteraciones genéticas monogénicas	Distrofia musc. Duchenne	X						X			
	Anemia celular falciforme	X						X			
	Hipercolesterolemia	X						X			
	Def. de alfaaminotripsina	X						X			
Enfermedades poligénicas o multifactoriales	Diabetes	*X			**X						
	Cirrosis	*X			**X						
	Cáncer	*X			**X						
	Artritis reumatoide	*X			**X						
Enfermedades adquiridas	VHB								X		
	VHC									X	
	VIH									X	
	Tuberculosis										X
	Aspergillus										X

*Si se busca la mutación génica implicada en el desarrollo de la patología, se recomienda la extracción de ADN de leucocitos.
**Si se investiga los niveles de expresión génica en determinado momento se optaría por una biopsia como fuente del ARNm.

Cuadro 11-2. Ventajas y desventajas de diversos métodos de extracción de ácidos nucleicos. De las diversas técnicas disponibles para la extracción de ácidos nucleicos, algunas como la extracción por cloruro de cesio se consideran ideales para ADN plasmídico. Algunas otras, como la extracción fenol-cloroformo, se emplean para cualquiera de los ácidos nucleicos (se realizan ligeras modificaciones para la extracción de ARN).

Método	Ventajas	Desventajas
Fenol/cloroformo (ADN) e isotiacianato de guanidina/fenol-cloroformo (ADN)	• Buen rendimiento. • Permite el aislamiento de todo tipo de ácido nucleico.	• El producto purificado requiere ser precipitado con alcaloides. • El fenol es tóxico y caústico.
Cloruro de cesio ADN plasmídico	• Excelente método para obtención de ADN plasmídico. • Alta pureza de los ácidos nucleicos. • Requiere muy pocas manipulaciones, lo que elimina el riesgo de contaminaciones esporádicas con rinasas.	• Laborioso y prolongado. • BrEf es cancerígeno. • Requiere eliminación de CsCl. • Indispensable el uso de material especializado.
Cromatografía por exclusión de tamaño (ADN o ARN)	• Tiempos de separación cortos y bien definidos. • Alta sensibilidad. • Reproducible.	• La recuperación del ácido nucleico purificado es ineficiente (pérdida de muestra).
Salting-out (ADN)	• Reactivos inocuos. • Material barato.	• Requiere una cantidad grande de muestra para obtener cantidades adecuadas de ADN.
Chelex (ADN)	• Previene la degradación del ADN por sus agentes quelantes. • No hay pérdidas considerables de ADN.	• Se obtiene ADNes, el cual no puede usarse para RFLPs.

do. A continuación se describen los pasos que implica esta metodología, esquematizados en la figura 11-1.

Lisis de las células y liberación del ADN

El primer paso en la extracción es la homogeneización del tejido y la lisis con detergentes (Triton o docedil sulfato sódico, SDS) capaces de romper las membranas celular y nuclear, y liberar el ácido nucleico de las células de donde se extraerá el ADN. El procedimiento de lisis celular es crítico y debe ser lo suficientemente agresivo como para lograr la fragmentación del tejido y la rotura de la membrana celular, sin dañar el ácido nucleico. La disgregación del tejido y su homogeneización se llevan a cabo en un *buffer* de lisis, que contiene sales, un detergente y proteinasa K, que libera el ADN de las histonas con las que se encuentra empaquetado y proteoliza proteínas celulares. La incubación con la enzima se realiza por 2 horas a 65°C. En el caso del ADN, la homogeneización se lleva a cabo con un homogeneizador *manual* para evitar la rotura mecánica de la molécula; para el ARN se emplea un homogeneizador eléctrico que gira a unas 200 a 1 000 rpm. En el caso de células con pared celular, como las células vegetales, se prefiere el empleo de sonicadores, los cuales, mediante ondas de sonido, rompen la pared celular y la membrana celular y nuclear, para liberar el ADN. Cuando la extracción se lleva a cabo a partir de células de sangre periférica, se recomienda el empleo de tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (EDTA 0.1 M al 0.02% V/V), ya que la heparina interfiere con enzimas como las polimerasas o las enzimas de restricción, que se emplearán en pasos subsiguientes. También es necesario retirar los eritrocitos, ya que por su alto contenido de hemoglobina y carencia de núcleo *contaminan* la muestra. La lisis de eritrocitos suele realizarse por adición de una solución hipotónica a base de cloruro de amonio. Los procedimientos comunes de lisis celular y su fundamento se incluyen en el cuadro 11-3.

La inactivación de nucleasas intracelulares previene la digestión enzimática de los ácidos nucleicos, lo que permite lograr la obtención de fragmentos relativamente largos de ADN y ARN. La lisis celular y la inactivación de las nucleasas intracelulares en general se llevan a cabo en el mismo paso, ya que la solución de lisis está compuesta por sales caotrópicas, como el EDTA, que secuestra cationes divalentes y, por lo tanto, inactiva las ADNasas.

Extracción de proteínas y lípidos con solventes orgánicos

Al concluir la lisis celular y la inactivación de nucleasas, se retiran los restos celulares, proceso conocido como purificación. Los métodos de purificación de ácidos nucleicos combinan estrategias tan diversas como la extracción/precipitación, la cromatografía, la centrifugación, la electroforesis y la separación por afinidad. Para la extracción por la técnica del fenol-cloroformo, se utiliza una solución que tiene una relación 25:24:1 v/v para el fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; generalmente se añade hidroxiquinolina al 0.1%, que funciona como antioxidante del fenol, un inhibidor parcial de ARNsas, quelante débil de iones metálicos, y que ayuda a identificar la fase orgánica por el color amarillo que le confiere. El alcohol isoamílico se emplea para reducir la espuma que puede generarse al agitar esta solución. Esta solución desnaturaliza las proteínas (entre ellas las nucleasas) y mantiene la separación de la fase orgánica y acuosa tras la centrifugación de la muestra. La eliminación de las

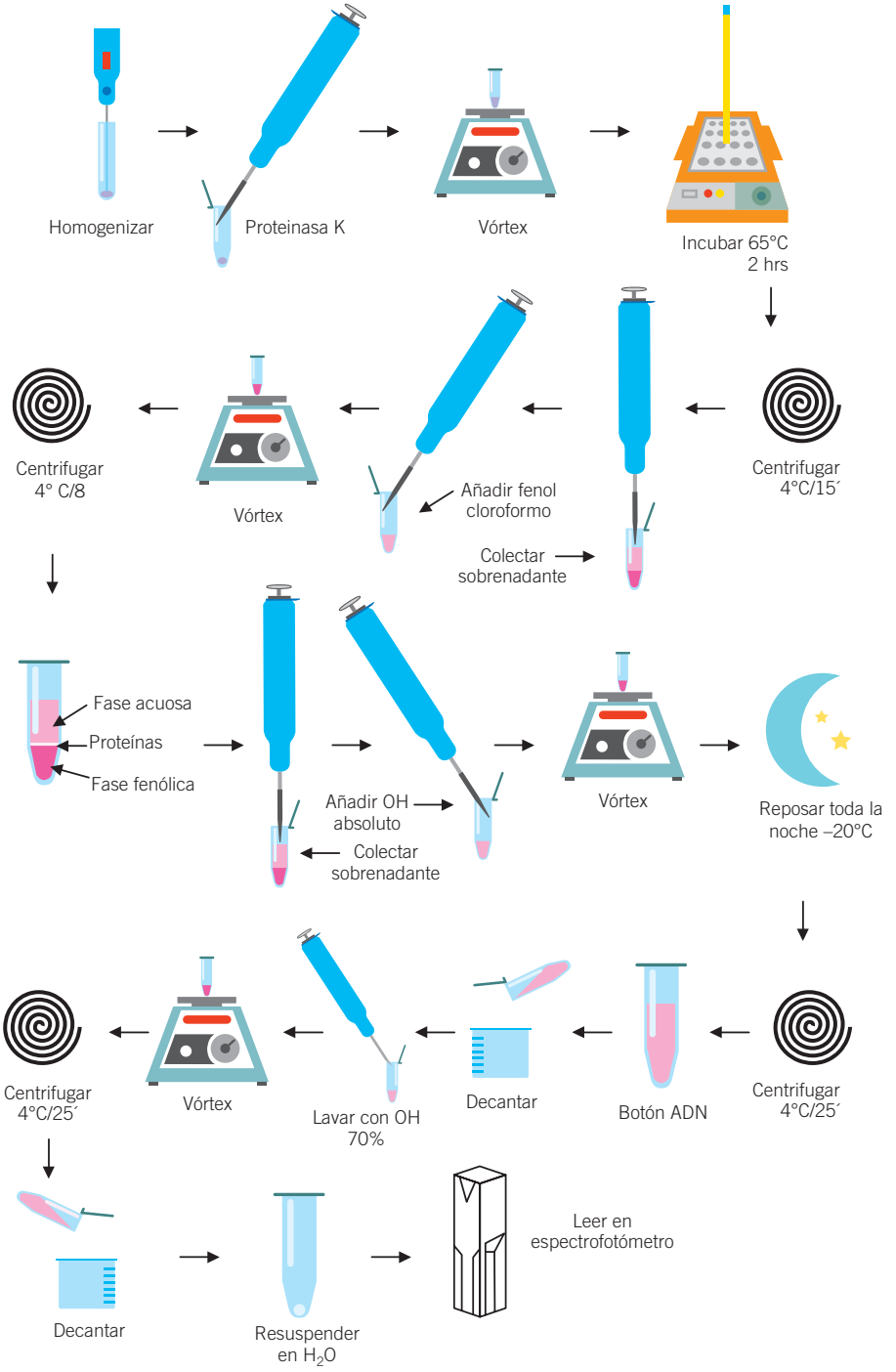


Figura 11-1. Extracción de ADN por la técnica fenol-cloroformo. Esta técnica es ampliamente usada por su economía y facilidad, lo que permite el aislamiento de ADN de buena calidad para su uso en diversas técnicas moleculares. Es importante considerar que el procedimiento se debe realizar en frío (4°C) después de la digestión enzimática. Una vez extraído se almacena a temperatura de –80°C para su preservación adecuada por varios años.

proteínas y componentes no hidrosolubles del homogenado celular se efectúa con la formación de dos fases con propiedades de solubilidad particulares *a*) una *fase orgánica* (fenólica) en la parte inferior del tubo de precipitado que contiene lípidos, proteínas y *debris* celulares, y *b*) una *fase acuosa* en la parte superior (menos densa), que contiene los ácidos nucleicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles. En la interfase se ubican la mayor parte de las proteínas debido a su contenido en aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, como se aprecia en la figura 11-2.

Cuadro 11-3. Procedimientos de lisis celular. La finalidad de la lisis celular es romper las membranas para liberar los ácidos nucleicos para su solubilización en solventes adecuados. En el caso de células con pared celular (ciertas bacterias y células vegetales), se requieren métodos más *agresivos* que destruyan también la pared celular.

Técnica/ejemplo	Mecanismo	Fuente
Homogenización Procedimientos mecánicos suaves/mortero Sonicación/aplicación de ondas ultrasónicas	• Utiliza la fuerza física para romper las membranas. • Ruptura de las membranas por ultrasonido.	• Tejido animal y vegetal • Cultivo celular • Biopsias • Bacterias • Cultivo celular
Detergentes/SDS	• Solubiliza las membranas celular y nuclear. El SDS también participa en la desnaturalización de nucleadas y la disociación de complejos nucleoproteicos.	• Bacterias
Soluciones/soluciones hipotónicas	• Producen un ambiente hipotónico, lo cual rompe la membrana celular.	• Bacterias • Tejido animal y vegetal • Cultivo celular • Biopsias
Disrupción enzimática/ lisozimas	• Debilita la pared celular al romper los enlaces que hay entre las moléculas del ácido N-acetilmurámico y la N-acetil glucosamina.	• Bacterias

El ADN es poco soluble en fenol, por lo que previamente suele estabilizarse con una solución amortiguadora de Tris que lo mantiene en un pH de 8.0 a 8.5, lo que hace que el ADN permanezca en la fase acuosa. La modificación del pH de 8.5 a 5.2 en esta solución puede favorecer la extracción de ARN frente a la de ADN.

Precipitación de ADN

El ADN disuelto en la solución acuosa se precipita añadiendo alcohol absoluto (isopropanol o etílico), ya que los ácidos nucleicos son insolubles en soluciones alcohólicas.

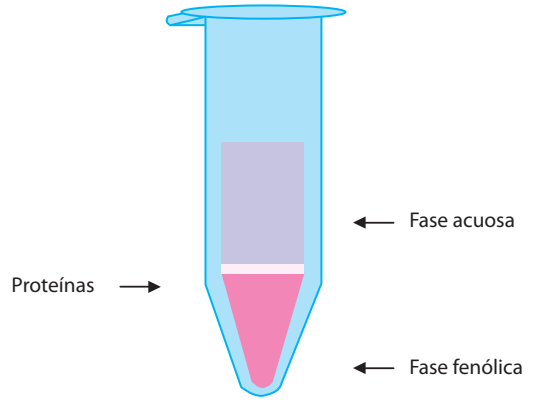


Figura 11-2. Fases en la purificación de ácidos nucleicos. En la extracción de ácidos nucleicos que involucra solventes orgánicos, una vez que estos últimos son añadidos se forman dos fases: la fase fenólica, ubicada en la parte inferior de tubo, la cual contiene proteínas y lípidos. A su vez, la fase superior es la acuosa, donde se ubica el ADN o ARN, según sea el caso. En la interfase entre ambas se localiza un acúmulo sólido de proteínas. La separación de la fase acuosa sin tocar la fase fenólica o la capa de proteínas es un paso crítico en el proceso de extracción del ácido nucleico que determina la pureza con que se aísla, y por lo tanto es determinante del índice 260/280 que se obtenga.

Cuando se emplea etanol (EtOH), la cantidad que se requiere para la precipitación es dos veces el volumen de la fase acuosa, mientras que con isopropanol (IprOH) se demanda solamente 0.7 veces el volumen de fase acuosa. Por otro lado, al emplear IprOH puede acelerarse el proceso, con un tiempo de incubación menor, y la precipitación puede realizarse a temperatura ambiente. Sin embargo, se ha reportado una mayor dificultad para disolver ácidos nucleicos precipitados con IprOH que con EtOH.

Para facilitar la precipitación también suelen añadirse cationes monovalentes (K^+, Na^+, $NH4^+$) a la solución de ácidos nucleicos cargados negativamente, con el fin de generar sales insolubles en alcohol de fácil precipitación. Si la cantidad del ácido nucleico en la muestra es baja, es posible incrementar sus agregados utilizando algún compuesto inerte que se asocie a los ácidos nucleicos y aumente su precipitación, sin interferir en futuras reacciones, como por ejemplo el glucógeno, que por su gran tamaño molecular forma una *red* que arrastra al ADN y facilita su precipitación. La precipitación se favorece incubando a bajas temperaturas (–20°C); una centrifugación posterior permite la obtención de una pastilla o botón del ácido nucleico en el fondo del tubo, al decantar el alcohol.

Lavado del ADN

El botón de ADN obtenido en la precipitación se lava con etanol al 70% por, al menos, dos ocasiones. El contenido de alcohol de esta solución (70%) mantiene al ADN precipitado, y el H_2O (30%) permite la disolución de las sales presentes. Después de los lavados, se seca el botón, lo que permite la evaporación del alcohol (espontánea o acelerada en un desecador).

Disolución del ADN y adición de ARNsa

Inmediatamente después de la evaporación del alcohol, el botón de ADN se disuelve en soluciones que aseguren su

preservación, como agua estéril y libre de ADNsas, o bien soluciones amortiguadoras, como el *buffer* Tris EDTA (TE). La cantidad de solución para disolver el ADN debe ser mínima para mantener una concentración adecuada del ácido nucleico que permita su empleo en técnicas posteriores, pero suficiente para lograr una disolución total del ADN. El ADN se disuelve por pipeteo constante del botón hasta lograr una solución homogénea. Los estudios indican que la disolución del ADN en *buffer* TE preserva por mayor tiempo y en mejores condiciones que cuando se disuelve en agua estéril; sin embargo, se prefiere disolver el ARN en agua-dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1%, lo que evita cualquier interferencia de las sales de las soluciones amortiguadoras y lo preserva de las ARNsas. Para eliminar el ARN *contaminante* proveniente de la extracción, la solución de ADN se incuba por una hora a 37°C con ARNsas para, así, evitar que el ARN interfiera en la cuantificación y en posteriores técnicas.

Cuantificación de los ácidos nucleicos

Existen diversos métodos de cuantificación de ácidos nucleicos; los más usados son la espectrofotometría y la fluorometría.

Espectrofotometría

El fundamento de la espectrofotometría es que cualquier solución que contenga moléculas suspendidas permite el paso de un haz de luz a través de ella en proporción inversa a la cantidad de moléculas que contiene. Los nucleótidos de ADN y ARN presentan la absorción máxima a una longitud de onda de 260 nm (luz ultravioleta, UV); por lo tanto, los espectrofotómetros son los aparatos más utilizados para determinar la concentración de ácidos nucleicos en solución. En la celda del espectrofotómetro un haz de luz atraviesa la solución de ácidos nucleicos y, cuando ha pasado por la muestra, un fotodetector mide la intensidad de luz absorbida. Mientras más luz absorba la muestra (absorbancia) mayor será la concentración de ácidos nucleicos. En la figura 11-4 se esquematiza el fundamento de la medición de concentración de moléculas en un espectrofotómetro.

La densidad óptica (OD) es la unidad de absorbancia y tiene valores particulares para cada molécula específica en una determinada longitud de onda por unidad de distancia. En el caso de los ácidos nucleicos, una OD de 1 a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADNds, 37 µg/ml de ADNss, 40 µg/ml de ARN o 33 µg/ml de oligonucleótidos. Según estos valores, se estableció la siguiente fórmula para el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos:

µg/µl de AN = OD a 260 nm × Dilución × constante / 1 000

En donde:

OD a 260 nm: absorbancia del ácido nucleico a 260 nm de longitud de onda.

Dilución: como se requieren volúmenes relativamente grandes de solución para cubrir la capacidad de las celdas de los espectrofotómetros, suelen manejarse diluciones 1:100 a 1:1000 del *stock* de ADN, en una solución en fosfato de sodio dibásico, 1.5 µM a pH 5.2 (Na_2HPO_4), que permite leer los nucleótidos sin interferencia. Algunos equipos permiten la lectura directa del ácido nucleico, como el espectrofotómetro NanoDrop™, usando volúmenes micrométricos (1 a 2 µM), donde la muestra no se diluye sino que se aplica directamente en el aparato.

Constante: proveniente del valor teórico de OD para cada ácido nucleico: a) 50 para el ADNds; b) 40 para ARN; c) 33 para oligonucleótidos, y d) 37 para ADNss.

Valoración de la pureza del ácido nucleico extraído

A pesar de que la técnica de extracción de ácidos nucleicos esté bien realizada, es prácticamente imposible eliminar la totalidad de las proteínas celulares que acompañan al ADN, así como solventes u otros componentes orgánicos empleados en la extracción, los cuales se presentan como contaminantes de la solución de ácido nucleico, lo que puede repercutir en las técnicas en que se pretenda emplear el ácido nucleico. Debido a que el espectro de absorción de luz de estas moléculas es característico, la absorción en otras longitudes de onda de la muestra de ácidos nucleicos se compara con la absorción a 260 nm, con el fin de valorar la pureza del ácido nucleico extraído. Así, para el cálculo de estos índices se procede a dividir la OD obtenida para la muestra de ácidos nucleicos a 260 nm entre la OD de interés.

Contaminación con proteínas: índice 260÷280

Dado que las proteínas (en particular los aminoácidos aromáticos) absorben luz a una longitud de onda de 280 nm, por lo común el índice de absorción 260÷280 nm se utiliza para valorar la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a la contaminación con proteínas. Cuando éste se encuentra entre 1.8 y 2.0, se considera óptimo, ya que valores cercanos a 1.8 indican que la muestra contiene casi exclusivamente ADN; para el ARN el índice óptimo es de 2.0. La presencia de proteínas hará disminuir este cociente, por lo que si la relación 260÷280 es menor que 1.8 la cantidad de proteína en la muestra es alta y es conveniente realizar un nuevo proceso de extracción. Un índice mayor que valores de 2.0 indica una rotura de las cadenas de los ácidos nucleicos, y se considera que es un ácido nucleico de calidad insuficiente, por lo que en este caso también se recomienda una nueva extracción. Sin embargo, este índice no es infalible y puede modificarse si el pH del medio se modifica; la acidez puede hacer disminuir hasta 0.2 a 0.3 unidades el índice, mientras que la basicidad puede aumentarlo. Por otro lado, la composición de nucleótidos libres afecta también esta relación, ya que si se calculase el índice 260÷280 para cada nucleótido se obtendría: guanina: 1.15, adenina: 4.50, cito-

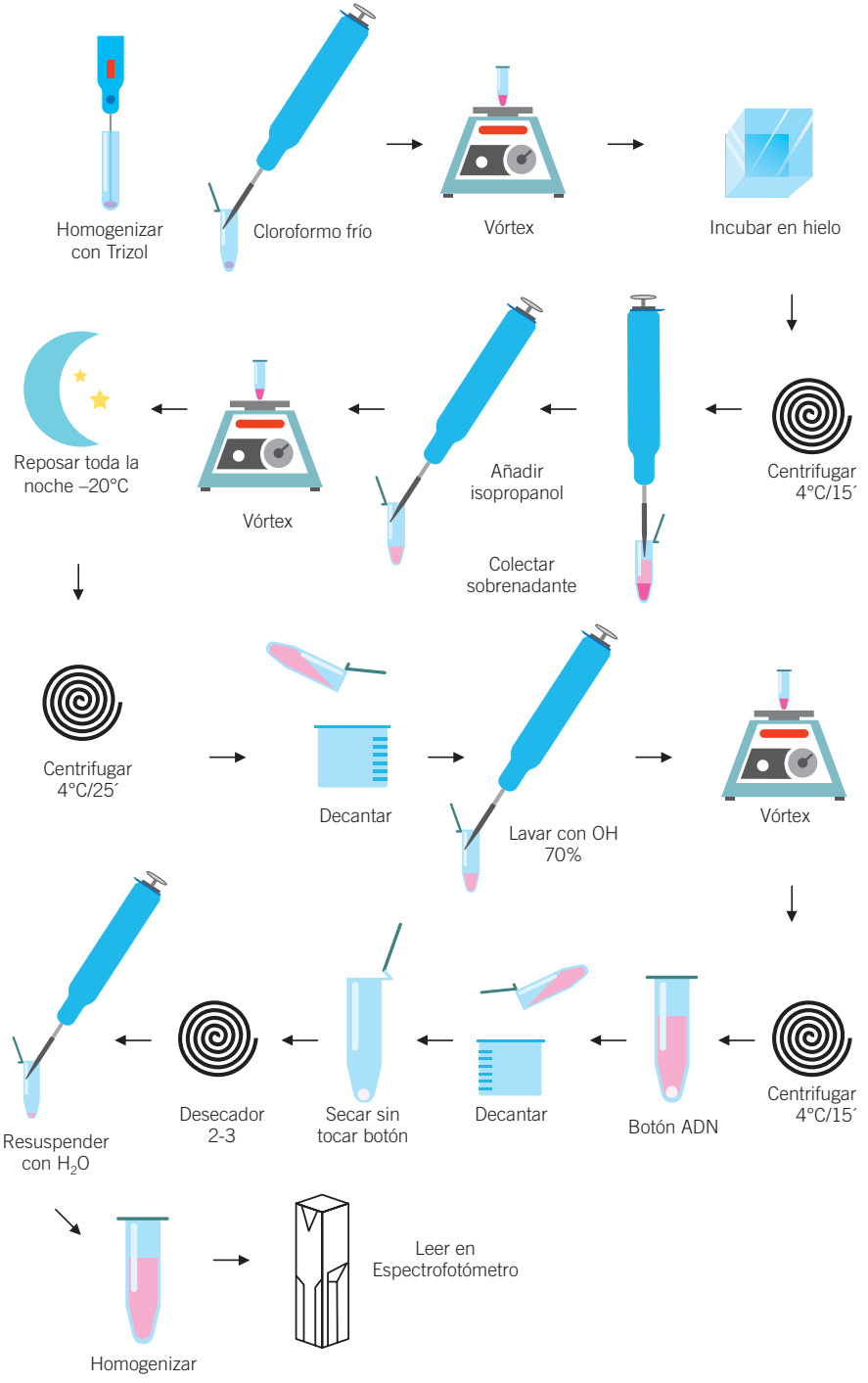


Figura 11-3. Fundamento del funcionamiento del espectrofotómetro. La luz UV o visible es emitida por una lámpara que a través de un condensador dirige los rayos hacia la muestra, ubicada dentro de una celda de cuarzo (material que no interfiere con la absorción de la muestra). La luz será absorbida de manera proporcional de acuerdo a la concentración de la muestra. La luz que no es absorbida por la muestra se mide por el detector, restándola a la luz inicial emitida y generando así una lectura en unidades de absorbancia que oscila entre 0.001 a 1.000.

sina: 1.51, uracilo: 4.00 y timina: 1.47; por ello, el ARN tendrá típicamente valores mayores que el índice 260÷280, por su contenido de uracilos, que difieren notablemente del índice que producen las timinas.

Contaminación con fenol: índice 260÷270

El fenol tiene un pico de absorbancia de 270 nm, por lo que a 260 nm todavía absorbe gran cantidad de luz. Debido a

este efecto solapante, la contaminación con fenol (utilizado en la extracción) sobreestima de forma significativa la concentración de ácidos nucleicos. Las preparaciones de ácidos nucleicos sin contaminación fenólica presentan un índice 260÷270 de alrededor de 1.2.

Contaminación con fenol y sales: índice 260÷230

La absorción de luz UV a una longitud de onda de 230 nm significa que la muestra está contaminada con iones fenolatos o tiocianatos, péptidos, compuestos aromáticos u otras sustancias. Para muestras puras de ácidos nucleicos el índice 260÷230 se espera en el rango 2.0-2.2; muestras con un índice menor indican la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm, como EDTA, carbohidratos y fenol. El TriZol™, empleado para la extracción de ARN, es una solución fenólica que absorbe luz UV tanto a 230 nm como a 270 nm.

Fluorometría

La cuantificación de ADN o ARN por fluorometría es 1 000 veces más sensible que la espectrofotométrica, y menos susceptible a las interferencias por proteínas y contaminantes presentes en la solución. Esta metodología se basa en la unión específica de colorantes fluorescentes al ácido nucleico, que absorbe luz de una determinada longitud de onda y emite luz de una longitud de onda superior (de menor energía). La relación entre la concentración del ácido nucleico y la intensidad de emisión fluorescente es directamente proporcional. Esta técnica requiere de estándares de concentración conocida, contra el cual interpolar los valores de la muestra.

Los colorantes más empleados son el Hoechst 33258, una bis-benzimida que se intercala en la doble cadena de ADN en regiones ricas en AT, que se excita en el espectro UV (350 nm) y emite en el visible a 450 nm. Su sensibilidad es de aproximadamente 10 ng/ml. Para la cuantificación de ARN, se realiza un pretratamiento con ADNsas, y suele emplearse RiboGreen, un colorante que absorbe a ~500 nm y emite a ~525 nm. Su sensibilidad es de 1 pg/µl. La desventaja principal de esta técnica es que no proporciona información de la pureza (como el índice A260:A280), ni de la posible degradación del ARN o ADN, por lo que se requiere realizar una electroforesis para comprobar la integridad del ácido nucleico. En los fluorómetros, la señal electrónica para la misma concentración de una sustancia varía de un instrumento a otro, por lo que mediciones hechas en equipos diferentes no pueden compararse. Se recomienda medir la fluorescencia en soluciones diluidas, pues se corre riesgo de no iluminar por igual todas las partes de la solución y cuantificar de forma inadecuada las distintas capas de la solución.

Preservación del ADN

El ácido nucleico se mantiene en congelación (–80°C es la temperatura recomendada) hasta su empleo. Es bien sabido que a menor temperatura la preservación se prolonga, así como que múltiples descongelaciones ocasionan una degradación progresiva en los ácidos nucleicos, por lo que se recomienda hacer alícuotas. También se dispone de métodos comerciales para la preservación del ADN, como son los tubos GenTegra™ ADN, que contienen una matriz química inerte que permite el almacenamiento del ADN seco y a temperatura ambiente por días o meses sin hidrólisis u oxidación.

Extracción de ADN por la técnica de salting OUT

Si bien muchos pasos y soluciones son comunes al método de extracción por fenol-cloroformo, la principal diferencia en esta metodología radica en el empleo de una solución concentrada de sales en lugar de solventes orgánicos para la lisis celular y la extracción de proteínas. La adición de una solución saturada de sales provoca la agregación de proteínas y *debris* celular, lo que permite su separación de los ácidos nucleicos. Generalmente, estas soluciones se preparan a saturación con NaCl. Una centrifugación posterior a la adición de la solución concentrada de sales precipita el *debris* y las proteínas, y deja libre el ADN en el líquido del sobrenadante, que se traspasa a un nuevo tubo para su lavado y precipitado.

Extracción de ARN

La extracción de ARN de células eucariotas se lleva a cabo para desarrollar estudios de expresión génica (análisis de los niveles de ARNm), para el diagnóstico de enfermedades ocasionadas por virus de ARN o, en el caso de bacterias, para análisis de expresión de genes o validar la clonación del ADN complementario (ADNc) en un vector. Al realizar la extracción de ARN de células eucariotas existen dos posibilidades: extracción de ARN total (ARNm, ARNr y ARN de transferencia, ARNt) y extracción oclusiva de ARNm. Es menos complejo y generalmente más barato la extracción de ARN total, y a menos que el ARNm sea sumamente escaso se opta por esta opción. También se dispone de kits comerciales basados en cromatografía de intercambio aniónico en fase sólida, que permiten purificar ARN total. Las células o tejidos se disgregan en una solución de tiocianato de guanidina para lisar las células e inactivar las ribonucleasas endógenas. El lisado celular se diluye con una solución alcohólica y se coloca en una columna de resinas de intercambio aniónico. La resina consiste en cuentas de sílica con superficie hidrofílica con tamaño de partícula reducido, hechas con cantidades elevadas de grupos dietil-amino-etil (DEAE). La purificación se basa en la interacción de estos grupos DEAE cargados positivamente con los grupos fosfatos (cargados negativamente) del ARN. Las proteínas y otros contaminantes son retirados con lavados. El pH y la concentración de sales de las soluciones amortiguadoras usadas en cada paso controlan la unión del ARN a la columna, la astringencia

Cuadro 11-4. Diferencias entre extracción de ADN y ARN. El uso de inhibidores de ARNsas y el pH es crítico para favorecer la extracción de ARN, especialmente en la técnica fenol cloroformo.

Diferencias entre métodos	ARN	ADN
Temperatura pH de solución fenol/cloroformo	Estrictamente 4°C 5 a 6	Preferentemente 4°C 8.2
Uso de inhibidores de ARNsas	Tiocianato de guanidina	N/A
Agua libre de ARNsas para las soluciones de trabajo	DEPC 0.1%	N/A
Proteinasa K	N/A	10 µg/ml
Homogeneizador	Eléctrico	Manual

del lavado y la elución del ácido nucleico. El ARN unido a la columna se eluye con soluciones iónicas acuosas. El proceso es rápido, aunque la cantidad de ARN suele ser limitada; sin embargo, la calidad del ARN obtenido –de la cual se dice es la equivalente a dos rondas de purificación con gradientes de CsCl– es mayor, ya que no hay arrastre de fenol. Esto hace que la purificación por columna sea ideal para el ARN empleado en aplicaciones como la transfección, la microinyección, la clonación y la secuenciación.

Consideraciones especiales al trabajar con ARN

La molécula de ARN es sumamente lábil, por lo que la clave en la extracción es evitar su degradación por acción de ribonucleasas propias de la célula. Los protocolos existentes se basan en una rápida inactivación de ARNsas endógenas, muy estables y que no requieren de cofactores para funcionar. Es muy importante tomar precauciones para evitar la contaminación con ARNsas exógenas, por ejemplo, tratar el agua y soluciones salinas con inhibidores de ARNsas –como el DEPC al 0.1%– , que inactiva las ribonucleasas por modificaciones covalentes. Si es posible, se recomienda el empleo de pipetas, puntillas y soluciones exclusivas para trabajar con ARN. El material de vidrio debe esterilizarse por calor seco por 4 horas a 150°C, mientras que el material plástico debe ser nuevo y estéril, o bien debe enjuagarse con cloroformo, ya que la esterilización por autoclave no inactiva por completo las ARNsas.

Para la lisis celular suele optarse por la lisis mecánica o enzimática. La disrupción mecánica se emplea con más frecuencia para tejidos frescos o células, usando un homogeneizador mecánico. La disrupción de tejido congelado es más laboriosa y se recomienda el uso de un homogeneizador eléctrico. La homogeneización del tejido se realiza habitualmente en una solución comercial fenólica con tiocionato de guanidina, llamada Trizol.®

En el mercado se encuentran disponibles soluciones comerciales estabilizadoras para el ARN (RNAlater®, Ambion), que permiten preservar la muestra sin congelarla. Estas soluciones mantienen el ARN estable en el tejido a 37°C por un día, a 25°C por una semana, a 4°C por un mes y a temperaturas bajo cero por tiempo indefinido.

Por otro lado, la disrupción enzimática se utiliza con más frecuencia para lisar células que contienen envoltura o cápsula, como bacterias y levaduras. La digestión con lisozima, zimoliasa o lisostafina suele seguirse de una sonicación, homogeneización o vórtex vigoroso en un *buffer* de lisis que contiene hidrocloruro de guanidina. Los métodos enzimáticos también pueden emplearse para tejidos eucariotes ricos en colágena, con la finalidad de digerirla antes de la lisis celular.

Las principales diferencias entre la extracción de ADN y de ARN se resumen en el cuadro 11-4.

Técnica de isotiocianato de guanidina/fenol-cloroformo para extracción de ARN total

El isotiocianato de guanidina y el fenol se utilizan como componentes de la solución de lisis. El isotiocianato de guanidina es un potente desnaturalizante de proteínas con capacidad de inhibir ARNsas, por lo que es ampliamente utilizado en la extracción de ARN. El fenol y el cloroformo se utilizan en la extracción del ARN con los mismos fines que en la extracción del ADN (formar las fases orgánica y acuosa, desnaturalizar proteínas e inactivar nucleasas). La solución fenólica empleada en la extracción del ARN es ácida (pH 5 a 6), para favorecer la extracción del ARN sobre la del ADN, ya que a pH ácido, el ADN es retenido en la fase orgánica y en la interfase, dejando el ARN en la fase acuosa. Posteriormente, el ARN es purificado a partir de la fase acuosa mediante precipitación a baja temperatura con isopropanol y con ayuda de una centrifugación de manera similar a como se hace con ADN. Este proceso se esquematiza en la figura 11-3.

Otros métodos de extracción

Los métodos comerciales para la extracción de ácidos nucleicos suelen basarse en cromatografía de intercambio aniónico, y emplean algún tipo de columna. Los kits son rápidos y proporcionan una buena calidad del ácido nucleico; sin embargo, son costosos respecto a los métodos con-

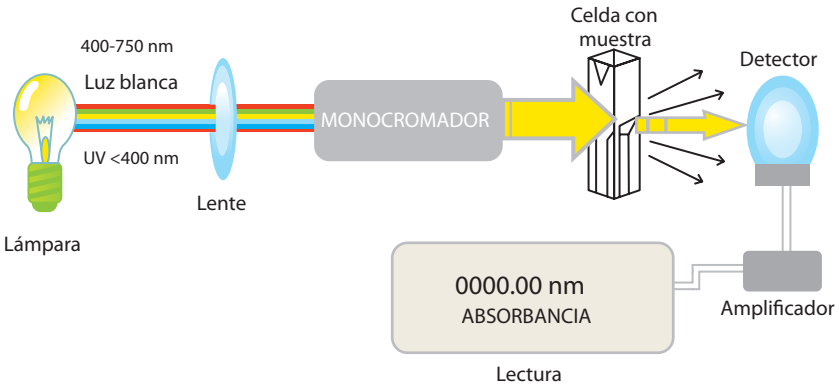


Figura 11-4. Extracción de ARN con fenol-cloroformo. La extracción de ARN es una modificación de la extracción de ADN por fenol-cloroformo. La principal diferencia es el empleo de inhibidores de ARNsas con la idea de impedir la degradación del ARN por las endonucleasas intracelulares de la muestra o presentes en el material. Es importante mencionar que la extracción de ARN debe realizarse en todo momento en frío (4°C) para inhibir la acción de las ARNsas, cuidando que los reactivos estén en refrigeración antes y durante su empleo.

vencionales de extracción. En esta sección se describen los fundamentos de algunos métodos alternativos de extracción empleados, entre los que se encuentran los métodos comerciales.

Gradiente con cloruro de cesio

La centrifugación en gradientes de CsCl sirve para la purificación de ambos ácidos nucleicos, aunque su uso principal es el aislamiento del ADN genómico y plasmídico. Es una técnica laboriosa, prolongada y que requiere de un equipo especializado, como una ultracentrífuga. Este método es el preferido para la elaboración de genotecas de ADNc, en las que se requiere ARN alta pureza e integridad o para aislar ARN de tejidos con altos niveles de ARNsa endógena, como el páncreas.

Cromatografía por exclusión de tamaño

Esta técnica se fundamenta en la separación de ácidos nucleicos de acuerdo con su peso molecular, empleando una columna empaquetada con una matriz de gel conformada por partículas poliméricas orgánicas o de sílice; ambos materiales, mecánica y químicamente estables y con un contenido bajo en grupos iónicos, originan una red de poros hidrofílicos uniformes. Las moléculas de gran tamaño no penetrarán en los poros del polímero, por lo que migran más rápidamente que las de menor tamaño, que sí son capaces de penetrar por los poros de la matriz. Esta técnica es el fundamento de la purificación en gel de agarosa de un ácido nucleico de determinado tamaño, usado sobre todo en la clonación de vectores. Es una metodología rápida y reproducible.

Cromatografía de intercambio iónico

Empleada por lo común para separar proteínas, se ha convertido en un método alternativo que permite la concentración y la purificación de ADN de calidad, de manera rápida y con la misma eficacia que la extracción por gradientes de CsCl. Los ácidos nucleicos interactúan con la resinas de carga positiva de las columnas de intercambio iónico, por lo que el ácido nucleico cargado negativamente se retiene y permite que otras moléculas, como proteínas o lípidos, se eluyan primero, dejando los ácidos nucleicos retenidos en la columna, los cuales se eluirán empleando condiciones que rompan su enlace con los compuestos iónicos de la resina purificados.

Cromatografía de absorción

Los ácidos nucleicos en solución se fijan de forma selectiva en sílice o vidrio, en presencia de sales caotrópicas, mientras que proteínas, metabolitos y otros contaminantes se eliminan mediante lavados. Posteriormente, los ácidos nucleicos se recuperan con una solución hiposalina.

La importancia de la calidad del ácido nucleico extraído es crucial para su uso posterior en técnicas moleculares, por lo que el personal que realice estos procedimientos debe estar capacitado para observar las buenas prácticas de laboratorio, condición indispensable para obtener una cantidad y una calidad adecuadas de ARN o ADN

Ejercicios de integración

1. Calcular la concentración de ARN en µg/µl obtenida de una muestra diluida 1:25 que arrojó una absorbancia de 0.185 leída a 260 nm.
2. Valorar la pureza de la preparación de ácidos nucleicos obtenida de una muestra cuya absorbancia a 260 nm fue de 0.57; mientras que a 280 nm fue de 0.31. Según el índice 260÷280, ¿qué pureza tiene la muestra? Explique la interpretación del resultado.
3. Calcule la cantidad de ADN por gramo de tejido si la concentración de ADN fue de 350 ng/µl, partiendo de 100 mg de muestra.
4. Dibuje el espectro de luz infrarrojo, visible y ultravioleta e indique en su esquema en qué longitud absorben los ácidos nucleicos y las proteínas; además, explique por qué estas moléculas, a esos nanómetros, presentan un máximo de absorción.
5. ¿Qué función tiene el detergente SDS frente a las membranas y las proteínas de la célula en la técnica de extracción de ácidos nucleicos?
6. Investigue y explique cuáles propiedades tiene el fenol que favorecen que los ácidos nucleicos se queden en la fase acuosa y no en la fenólica

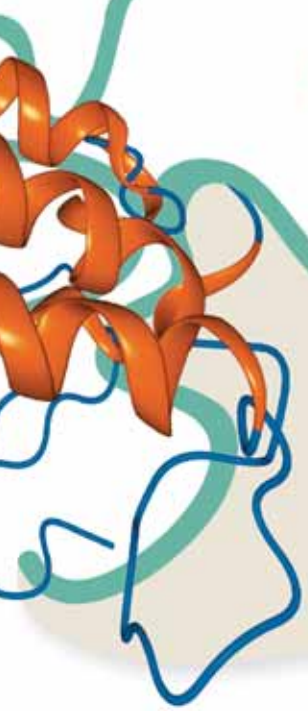
Bibliografía

Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem,* 1987;162:156–159.

Miller D.D., Dykes H.F., Polesky S.A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cell. *Nucleic Acids Res,* 1988;16:1215.

Quiagen. *Sample and assay technologies.* RNeasy MicroKit English (pdf). Disponible en: http://www.qiagen.com/products/.

Sambrock J., Russell D., Molecular cloning: A laboratory manual, Vol 1, 3ª ed. Nueva York: Cold Spring Harbor, 2001.



Capítulo 12

Electroforesis

David Alejandro López de la Mora / Ana Soledad Sandoval Rodríguez

Introducción

En biología molecular, una gran cantidad de técnicas que se realizan comúnmente requieren el uso de la electroforesis, por lo que supone una parte importante del procedimiento sistemático del análisis (separación, purificación, preparación) de los ácidos nucleicos y las proteínas. La mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran; como consecuencia, pueden desplazarse cuando se ven sometidas a un campo eléctrico hacia el polo de carga opuesta al de la molécula. A diferencia de las proteínas, que pueden tener una carga positiva o negativa, los ácidos nucleicos sólo poseen carga negativa, debido a su esqueleto de fosfatos. Por lo tanto, en una electroforesis, los ácidos nucleicos migrarán hacia el polo positivo; es decir, el ánodo. En el caso de las proteínas se realiza pretratamiento con detergentes, como el dodecilsulfato de sodio (SDS), que les confiere carga negativa; con ello se homogenizan las proteínas de la muestra y todas migrarán hacia el polo positivo, y sólo se separarán por tamaño.

El principio de la electroforesis consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz porosa, según su peso molecular o tamaño; movimiento generado por el campo eléctrico.

Elementos necesarios para una electroforesis

Para realizar una electroforesis se requiere de una serie de elementos que se describen a continuación, que se enlistan en la figura 12-1.

Cámara de electroforesis

La cámara de electroforesis es un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico alrededor de un gel donde se depositan las muestras. Este campo se genera dentro de una solución amortiguadora en la que se encuentra sumergido el gel que contiene las muestras; el alto contenido de electrolitos permite la transmisión de la corriente eléctrica, manteniendo el pH estable al paso de la corriente. La cámara cuenta con dos polos que se conectan a una fuente de energía. En las cámaras de electroforesis vertical el polo positivo se encuentra en la parte inferior de la cámara (figura 12-2A) y en las horizontales, en uno de los extremos (figura 12-2B). En ambos tipos de cámaras el polo positivo se distingue con color rojo y el negativo con negro.

Gel

La muestra debe colocarse sobre un medio de soporte, con la finalidad de evitar perturbaciones mecánicas durante la separación. El soporte idóneo es un gel semisólido o gelatinoso, compuesto por polímeros que forman una especie de malla o microporos tridimensionales a través de los cuales avanzan las moléculas, según el peso molecular, lo que permite la separación por tamaño de los diferentes componentes de la muestra. Los geles pueden ser de agarosa o poliacrilamida. Para la separación de ácidos nucleicos se usan geles de agarosa o acrilamida y para proteínas, sólo de acrilamida.

Geles de agarosa

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente, que se disuelve fácilmente en temperatura de 50 a 60°C, se torna líquida y se solidifica cuando se enfría formando un gel altamente poroso. Para elaborar el gel se pesa la cantidad de agarosa requerida, se disuelve en una solución amortiguadora adecuada de la misma composición y concentración que el *buffer* de corrimiento y se calienta hasta formar una solución. Sin dejar enfriar se vacía inmediatamente sobre un molde de forma rectangular y en

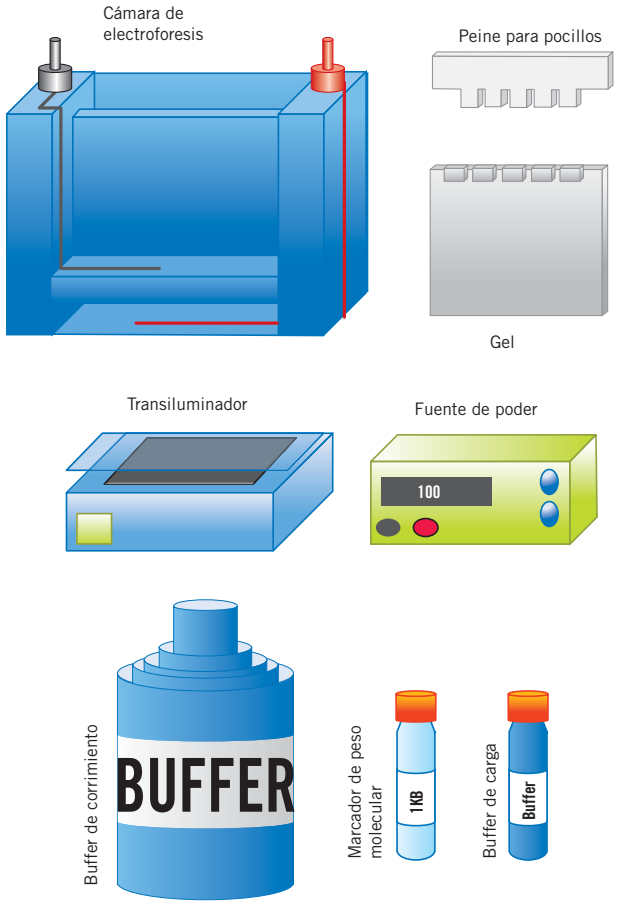


Figura 12-1. Elementos necesarios para una electroforesis. En la imagen se aprecian los elementos que se requieren para el corrimiento electroforético y visualización del gel.

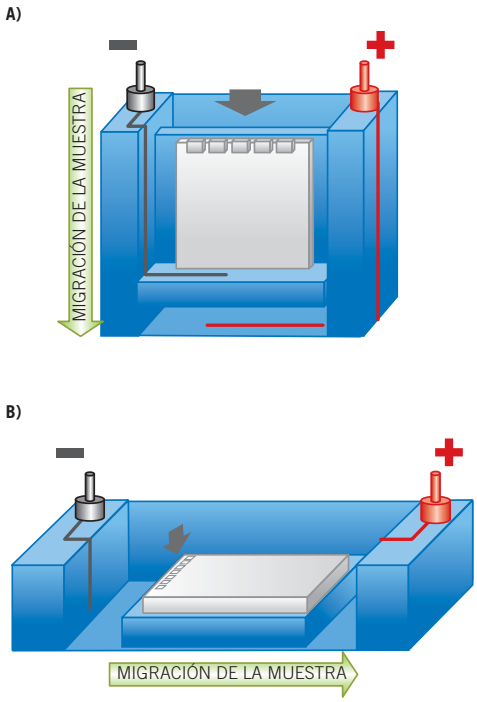


Figura 12-2. Cámaras de electroforesis. **A)** En las cámaras de electroforesis vertical el corrimiento de la muestra sigue la gravedad, ya que el polo positivo de encuentra en la parte inferior de la cámara. **B)** En la electroforesis horizontal debe cuidarse que el ánodo se coloque hacia el extremo del gel donde corren las muestras, de lo contrario las muestras se salen del gel.

uno de los extremos se coloca un aditamento en forma de peine con la finalidad de generar los pocillos u orificios donde se colocarán las muestras (figura 12-3). La agarosa posee ventajas sobre la acrilamida, ya que no es un compuesto tóxico y permite realizar el análisis de ácidos nucleicos con pesos moleculares variados, según la concentración de agarosa que se emplee. Sin embargo, su poder de resolución es menor que el de los geles de poliacrilamida. La concentración de agarosa se escoge según el tamaño del ácido nucleico que se vaya a analizar (cuadro 12-1). El tamaño de los poros de la matriz del gel depende de la concentración de agarosa utilizada y la concentración de agarosa es inversamente proporcional al tamaño del poro obtenido; esto es, a mayor concentración, menor tamaño de los poros, y viceversa, si los poros son pequeños la migración del ácido nucleico es más lenta. La figura 12-4 representa la migración de las moléculas de ADN en un gel de agarosa. Durante la electroforesis, los ácidos nucleicos lineales con un peso molecular alto migran al ánodo más lentamente que los de menor peso molecular. Esto se debe a que los ácidos nucleicos de peso elevado tardan más tiempo en atravesar los poros de agarosa. En el caso de ácidos nucleicos no linearizados, como plásmidos circulares (conformación nativa), ARN con estructuras secundarias o ADN de gran longitud, la migración no sólo depende del peso molecular sino también del grado de empaquetamiento que presenten. En la electroforesis de un plásmido, por ejemplo, se visualizan tres conformaciones distintas de la misma molécula: la forma superenrrollada, la semirrelajada y una relajada. Esto se refleja en tres bandas de "tamaño" diferente, aunque se trate del mismo plásmido (figura 12-5). Por ello, antes de una electroforesis es importante la linearización y la eliminación de estructuras secundarias por desnaturalización de la muestra. La concentración de agarosa más utilizada para electroforesis de ácidos nucleicos es de 0.5 a 2%.

Geles de acrilamida

La acrilamida es un polímero sintético, termoestable, incoloro y químicamente inerte, con el que se pueden generar geles con un amplio intervalo de tamaños de poro. El gel de poliacrilamida es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. El tamaño de poro de un gel de acrilamida está determinado por la concentración total de acrilamida presente (acrilamida + bisacrilamida), que generalmente se maneja en proporción de 19:1. Regulando la concentración de ambas y su proporción

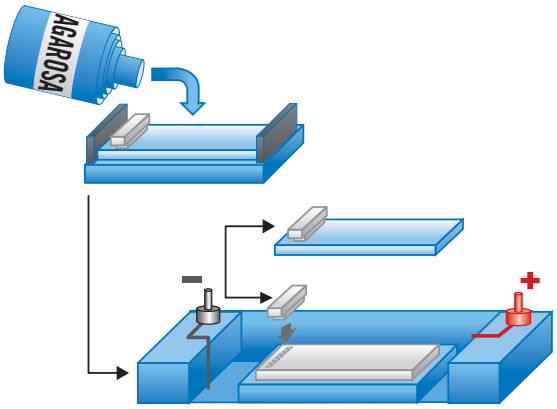


Figura 12-3. Preparación de un gel de agarosa. La agarosa es un polvo que para disolverse requiere calentarse hasta la ebullición del solvente. Una vez obtenido el líquido de agarosa, antes de que se enfríe a menos de 50°C se coloca en una cámara para formar el gel. El gel se coloca de manera que los pocillos queden en el extremo donde se localiza en polo negativo de la cámara de electroforesis, para permitir que la muestra corra a lo largo del gel.

se consiguen distintas porosidades, siempre menores que la de los geles de agarosa. Cuando la acrilamida se encuentra en disolución acuosa experimenta autopolimerización de forma espontánea y lenta, con el resultado de que las moléculas de acrilamida se unen cabeza con cola. En presencia de un sistema generador de radicales libres se da una polimerización vinílica en la cual se activan los monómeros de acrilamida, quedan en estado de radical libre y reaccionan

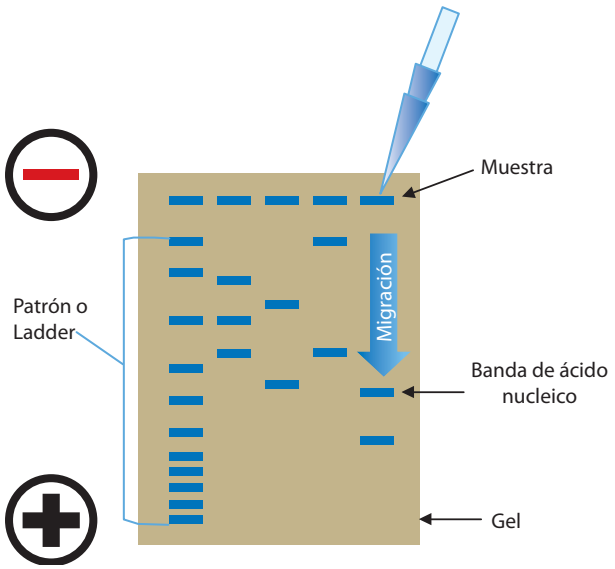


Figura 12-4. Electroforesis de ácidos nucleicos. Se representa un gel de agarosa en el cual se visualiza un marcador de peso molecular junto a las muestras para ayudar en la determinación del peso molecular de los fragmentos. La muestra se carga en los pocillos y se deja correr hacia el polo negativo.

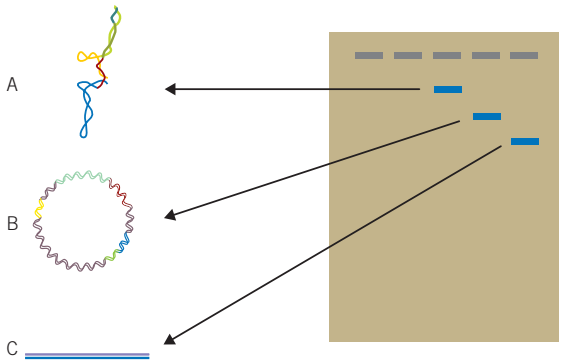


Figura 12-5. Perfil electroforético de un plásmido. Aunque la molécula de ADN (en este caso un plásmido) tenga la misma longitud en pb, puede demostrar diversos patrones de corrimiento electroforético según la conformación de la estructura. A) Plásmido superenrrollado. B) Plásmido circular. C) Plásmido linearizado.

rápidamente para formar polímeros de cadena larga. El polímero en disolución no forma un gel, sino que se encuentra en estado viscoso debido a que las cadenas pueden deslizarse unas sobre otras; la formación del gel requiere que varias cadenas queden trabadas (lo que se consigue con la bisacrilamida). La acrilamida es una neurotoxina, por lo que debe manejarse con precaución. También es esencial almacenarla en un lugar refrigerado, seco y oscuro para reducir la autopolimerización y la hidrólisis. La bisacrilamida, o N,N'-metilenbisacrilamida, está compuesta por dos moléculas de poliacrilamida enlazadas por sus grupos amino, no reactivos. Este compuesto polimeriza conjuntamente con la acrilamida y establece puentes entre las cadenas lineales de poliacrilamida, con lo que se evita su deslizamiento y conduce a la formación del gel. El gel de acrilami-

Cuadro 12-1. Concentraciones de agarosa para geles de ácidos nucleicos. El cuadro indica las concentraciones de agarosa recomendadas según el peso molecular que se espera encontrar en las muestras. Al aumentar la concentración de agarosa se reduce el poro del gel, lo que permite la discriminación de fragmentos de menor tamaño.

Agarosa (%)	Tamaño de banda
0.3	> 700 pb
0.5	700 pb a 25 kb
0.8	500 pb a 15 kb
1.0	250 pb a 12 kb
1.2	150 pb a 6 kb
1.5	80 pb a 4 kb
2.0	100 pb a 3 kb
3.0	500 pb a 1 kb
4.0	100 pb a 500 pb
6.0	10 pb a 100 pb

da es capaz de soportar mayores voltajes que la agarosa y es susceptible de teñirse por varios procedimientos, y también puede desteñirse en caso necesario. Los geles de acrilamida pueden digerirse para extraer fracciones separadas (bandas) o desecados para su exposición radiográfica y registro permanente. La electroforesis con geles de acrilamida siempre se realiza en cámaras verticales. La electroforesis de proteínas emplea geles de acrilamida de dos capas de gel a diferente concentración de acrilamida, un gel superior o concentrador y un gel inferior de separación o de resolución. El gel de concentración tiene un tamaño de poro grande y se prepara con un amortiguador de Tris/HCl con pH de 6.8, dos unidades de pH menor que el *buffer* de corrimiento hecho de Tris/SDS/glicina. Estas condiciones proporcionan un ambiente para que las proteínas recubiertas con SDS se concentren. El tamaño del gel de apilamiento debe ser del doble de la altura del pozo donde se va aplicar la muestra. Este gel se coloca sobre el gel de resolución, un gel de poliacrilamida de poro pequeño hecho de un amortiguador de Tris/HCl, con un pH de 8.8. En el gel de resolución es donde las proteínas se separan de acuerdo con su tamaño, de manera dependiente del porcentaje de acrilamida utilizado para su preparación, como se describe en el cuadro 12-2. La adición de SDS a los geles de poliacrilamida es opcional; cuando se hace, mantiene a las proteínas en estado extendido, lo que facilita la movilidad electroforética de la proteína mediante el gel y permite que la movilidad dependa exclusivamente de su masa molecular. En la figura 12-6 se representa la electroforesis de proteínas en gel de acrilamida.

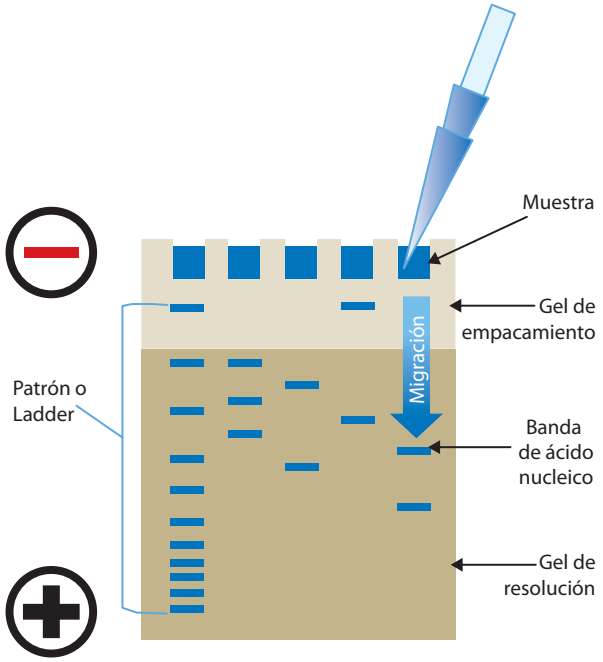


Figura 12-6. Electroforesis de proteínas. Las proteínas se corren en geles de acrilamida formados por dos fases. Una fase superior donde las moléculas se concentran y una inferior donde la muestra se separa en sus componentes según su peso molecular. Al estar pretratadas con SDS, las proteínas se rodean de cargas negativas, lo que les permite migrar hacia el polo positivo con independencia de su carga inicial.

Buffer de corrimiento

El *buffer* de corrimiento es de la misma composición y pH que el *buffer* con el que se prepara el gel de resolución, ya sea de agarosa o de acrilamida. Éste proporciona el medio para la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza el corrimiento. En el caso de los ácidos nucleicos, pueden emplearse TBE o TAE como *buffer* de corrimiento. El *buffer* TBE contiene Tris base, ácido bórico y EDTA, y se maneja a un pH de 7.2. El *buffer* TAE contiene Tris base, ácido acético y EDTA, ajustado a pH 8.5. El *buffer* de corrimiento de electroforesis de proteínas lleva Tris, 25 mM, SDS al 1% y glicina, 192 mM, a un pH 8.3.

Cuadro 12-2. Concentraciones de acrilamida para geles de ácidos nucleicos. El cuadro indica las concentraciones de acrilamida recomendadas según el peso molecular que se espera encontrar en las muestras. Al aumentar la concentración de acrilamida se reduce el poro del gel, lo que permite la discriminación de fragmentos de menor tamaño.

Acrilamida (%)	Pares de bases
3.5	1 000 a 2 000
5.0	80 a 500
8.0	60 a 400
12.0	40 a 200
15.0	25 a 150
20.0	6 a 100

Marcador de peso molecular

Son moléculas de ADN o de proteínas que permiten determinar por comparación el tamaño de los fragmentos de ácidos nucleicos o proteínas contenidos en las muestras sometidas a electroforesis. Los marcadores de peso molecular están disponibles comercialmente en amplia variedad. En el caso de marcadores de peso molecular de ácidos nucleicos, éstos pueden ser fagos o plásmidos sometidos a corte con enzimas de restricción que generan fragmentos de tamaño; también puede tratarse de moléculas de ADN sintéticas denominadas *escaleras*, porque contienen fragmentos con incrementos de tamaño gradual. En la figura 12-7 se pueden ver las bandas que se obtienen de los fragmentos con un marcador de uso común, como es el fago Phi X174/Hae III y una escalera denominada *1 Kbase plus ladder*. Los marcadores de peso molecular de proteínas suelen ser una serie de proteínas de peso molecular conocido (que van

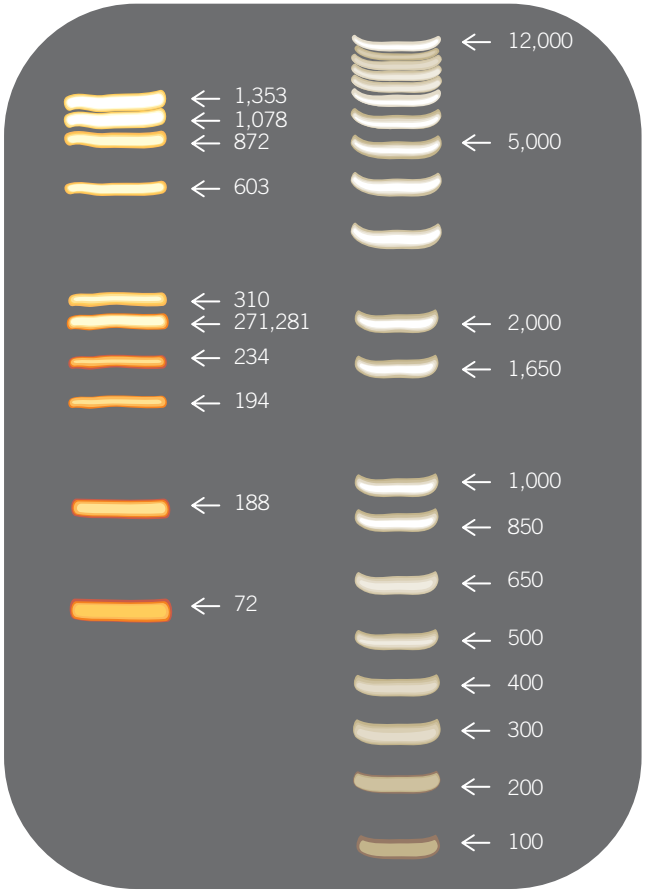


Figura 12-7. Marcadores de peso molecular para ADN. En la imagen el primer carril corresponde a las bandas que se obtienen de los fragmentos con un marcador como es el fago Phi X174 digerido por la enzima Hae III, mientras el segundo carril muestra los fragmentos de una escalera formada por segmentos sintéticos de ADN.

desde 10 hasta 300 kDa), las cuales pueden estar teñidas o coloreadas. En los casos en que la electroforesis sea un paso previo para la técnica de Western blot, también se dispone de marcadores de peso molecular de proteínas recombinantes que contienen un sitio de unión a inmunoglobulina (Ig) G. El sitio de unión a IgG puede ser reconocido por un anticuerpo primario o secundario empleado para la detección de la proteína buscada por Western blot. Este sistema es compatible con quimioluminiscencia, el marcaje cromogénico y la fluorescencia.

Buffer de carga

Este amortiguador tiene como fin brindar peso, densidad y color a la muestra, lo que facilita su depósito en el pocillo y evita su salida del gel; permite, además, monitorear el corrimiento de la muestra en el gel. Se emplea en relación 1:3 para ácidos nucleicos o 1:6 para proteínas, respecto a la cantidad de muestra. El *buffer* de carga de ácidos nucleicos contiene Tris, azul de bromofenol, azul de xileno y glicerol. Mientras que el *buffer* de carga para proteínas contiene Tris-HCl, pH 6.8, ditiotritiol (DTT), SDS, glicerol y azul de bromofenol. En el caso de que se deseen condiciones desnaturalizantes y reductoras, deberá añadirse beta-mercaptoetanol a este *buffer* y habrá que calentar las muestras a 95°C por 5 minutos.

Transiluminador ultravioleta

El transiluminador transmite luz del espectro ultravioleta a través de la muestra, excitando la molécula cromogénica que emite energía fluorescente que permite visualizarla. El transiluminador es el sistema empleado con más frecuencia por ser simple y efectivo. En general emiten energía a una longitud de onda a 302 nm, aunque también existen para 254 y 365 nm; y suelen contar con un botón para baja/alta intensidades por si se requiere una menor exposición de la muestra a la luz ultravioleta. Algunos también permiten la selección de entre dos longitudes de onda, lo que los hace más flexibles. Los epitransiluminadores (365, 480 nm) generan la emisión visible por fluorescencia igual que el transiluminador pero, a diferencia de éste, la fuente de energía se encuentra reflejada y no pasa a través de la muestra. El epi-iluminador es efectivo en geles muy densos.

Una vez que se tienen los materiales necesarios existen dos maneras de realizar la electroforesis: de forma horizontal y vertical.

Electroforesis horizontal

Se lleva a cabo con gel de agarosa para ácidos nucleicos. Para el corrimiento el *buffer* debe cubrir el gel, con la finalidad de evitar que se seque por el calentamiento inducido por el paso de la corriente eléctrica. Al momento de cargar las muestras en los pocillos, se puede optar por hacerlo *en seco*; esto es, llenar parcialmente la cámara con líquido de corrimiento de tal manera que la parte superior del gel no se cubra de *buffer* para que los pocillos puedan llenarse sin la interferencia del líquido. Una vez cargada la muestra, se corre por unos minutos a bajo voltaje hasta que la muestra entre en el gel y entonces se cubre del todo con el *buffer* de corrimiento. También existe la técnica denominada *electroforesis submarina*, en la que la totalidad del gel se cubre con *buffer* de corrimiento, desde el momento de cargar las muestras en los pocillos como se ejemplifica en la figura 12-8. En esta técnica el *buffer* siempre debe cubrir el gel, y se llama submarina cuando la muestra se coloca con el gel sumergido en el *buffer*.

Electroforesis vertical

Empleada exclusivamente con gel de poliacrilamida, se utiliza para proteínas o ácidos nucleicos de pequeño tamaño. El gel debe estar contenido entre dos placas rectangulares

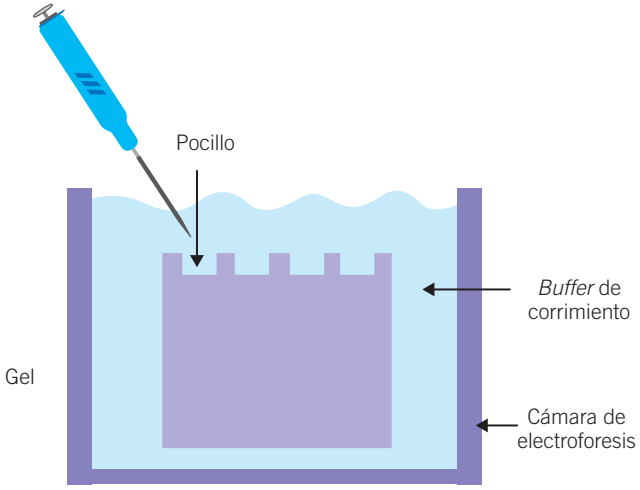


Figura 12-8. Ejemplificación de electroforesis submarina. La muestra se coloca después de haber vertido el *buffer* de corrimiento y retirado el peine que sirve de molde para la formación de los pocillos.

de vidrio donde la corriente eléctrica se genera gracias al *buffer* en el que se encuentra embebido el gel y llena las cubetas o compartimientos del ánodo y el cátodo como se aprecia en la figura 12-9.

Procedimiento general de una electroforesis

A continuación, se exponen los pasos de los que consta una electroforesis típica.

1. Preparar un gel de agarosa o acrilamida a la concentración requerida.
2. Mezclar las muestras a analizar con un *buffer* de carga adecuado.
3. Cargar las muestras en el gel.
4. Realizar la corrida electroforética al voltaje pertinente.
5. Visualizar los ácidos nucleicos

Electroforesis de ácidos nucleicos

El método más común para la electroforesis de ADN es elaborar un gel horizontal de agarosa, con una concentración de 0.5 a 2%. La carga eléctrica de la molécula de ADN la otorgan sus grupos fosfato, de carga negativa, y cuyo número es igual al doble del número de pares de bases. Dado que la forma de la molécula de ADN siempre es la misma, la movilidad de la electroforesis dependerá únicamente de la longitud del ADN (pb) y se representará en bandas (figura 12-10). El corrimiento se realiza a voltajes de entre 25 y 100 V; a mayor voltaje mayor velocidad de corrimiento. El avance electroforético se monitorea a través de la visualización de los colorantes (azul de bromofenol y azul de xileno) contenidos en el *buffer* de carga con el que se mezcló con la muestra previa a su colocación en el pocillo. Si los fragmentos de ADN son pequeños (menos de 50 pb) o bien se requiere discernir entre fragmentos de ácidos nucleicos con una diferencia de longitud de 1 a 20 pb, se recomienda utilizar un gel de poliacrilamida que permita esta resolución. Las agarosas con un punto de fusión bajo permiten la preparación de geles a elevadas concentraciones y se aconseja para obtener una buena separación de moléculas de ADN con < 1 000 pb. Son ideales para preparar geles analíticos de productos procedentes de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otras. Algunas son capaces de separar fragmentos que difieren entre 10 y 20 pb. Para la preparación del gel debe estandarizarse primero qué concentración de agarosa es la más adecuada, según la muestra que se desee separar.

El volumen de agarosa depende del tamaño de la cámara de electroforesis; 20 a 25 ml son suficientes para las dimen-

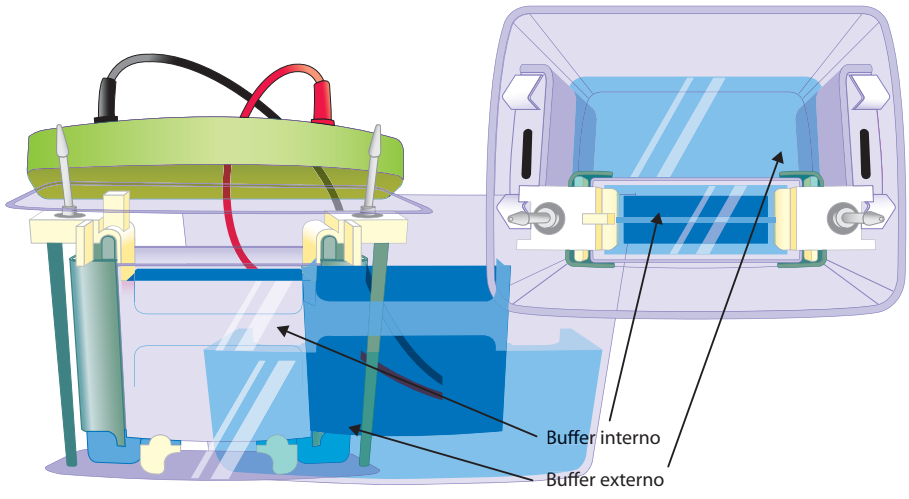


Figura 12-9. Electroforesis vertical. En esta cámara se aprecia cómo el gel de acrilamida ha quedado embebido en *buffer* de corrimiento en su extremo superior gracias a la colocación de amortiguador en la parte interna de la cámara. El *buffer* de la parte externa permite que el polo positivo cuente con la misma solución *buffer* que transmita la corriente a la parte inferior del gel.

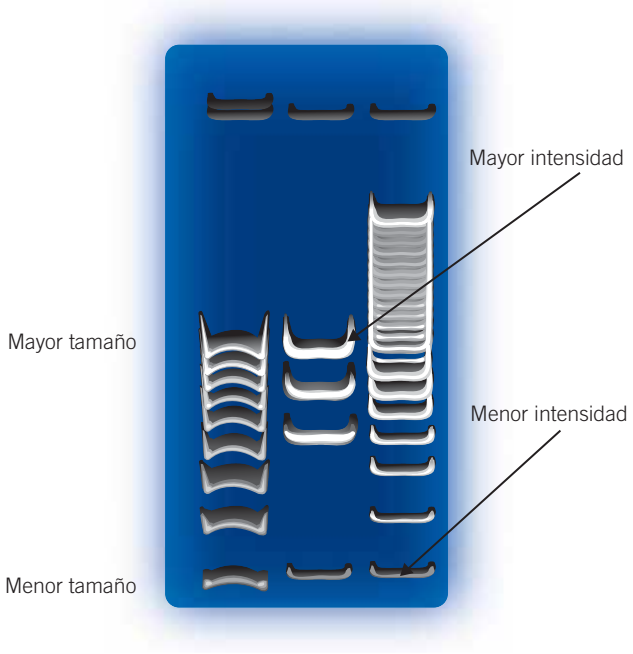


Figura 12-10. Movilidad de fragmentos de ADN. La imagen muestra fragmentos de ADN de mayor a menor tamaño (parte superior hacia parte inferior) visualizados con un agente intercalante. Se aprecia cómo la intensidad de la banda observada es variable, lo que indica *groso modo* cuál fragmento se encuentra en mayor cantidad y cuál en menor.

siones más comunes del gel: 8 × 6 × 0.5 cm (L × A × A). Inmediatamente después de vaciar la agarosa a la cámara, debe insertarse el o los peines necesarios. La agarosa tarda en solidificar alrededor de 20 minutos, mientras que la poliacrilamida, unos 30 minutos. Una vez solidificado el gel, se añade el *buffer* de corrimiento (TAE o TBE) a concentración 1×, cubriendo perfectamente el gel (0.5 a 1 cm por encima del gel) y se retiran los peines. Las muestras se mezclan con el *buffer* de carga y se depositan cuidadosamente en los pocillos, evitando que se salgan y puedan entrar en otros pozos contaminando el pocillo contiguo. Debe considerarse el uso de un marcador de peso molecular en, por lo menos, uno de los carriles, para la determinación del peso molecular de la muestra. Este marcador también debe mezclarse con un *buffer* de carga, excepto cuando ya viene preparado para su uso de la casa comercial en que se obtuvo.

Una vez depositadas las muestras en los pocillos se procede a la transmisión de la corriente eléctrica. Se conectan los cables de la fuente de energía de cada polo eléctrico a la cámara de electroforesis en el electrodo que le corresponda y se aplica un voltaje de acuerdo con el peso molecular de las moléculas de ADN que se va a separar. Para el caso de productos de PCR (entre 100 pb y 1.5 kb), se recomienda usar voltajes comprendidos entre 75 y 100 V. Para muestras de ADN genómico y plasmídico (> 2 kb) se recomienda aplicar valores de entre 25 y 75 V. En la figura 12-11 se aprecia una fuente de energía, con su pantalla, que indica el amperaje. Es importante que se estandarice el tiempo de electroforesis a fin de conseguir la mejor resolución posible.

Durante el corrimiento se monitorea la migración de la muestra con colores que contiene el *buffer* de carga, donde se observa el color azul y el verde correspondientes a los colorantes azul de bromofenol y azul de xileno, respectivamente. En geles de agarosa, dentro del rango de 0.5 y 1.5%, el azul de xileno migra de manera similar a un fragmento de ADN de 4 kb, mientras que el azul de bromofenol se comporta como un fragmento de 300 pb. La electroforesis se detiene cuando se considera que la muestra se localiza en la posición deseada, o bien cuando la muestra ha corrido por lo menos tres cuartas partes del gel.

Hay múltiples factores que pueden afectar la migración del ADN, como la concentración del gel utilizado, el tamaño de la molécula de ADN muestra, el empaquetamiento del ADN, el voltaje, la temperatura del *buffer* de corrimiento (que puede aumentar demasiado si el voltaje es muy alto), la contaminación con agentes intercalantes en la muestra, la composición del *buffer* de corrimiento, etcétera.

Visualización de las muestras

Para la visualización de los ácidos nucleicos se utiliza un colorante fluorescente, el bromuro de etidio, que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN y el ARN. Debido a esta propiedad es un agente mutagénico y debe manipularse con cuidado. El bromuro de etidio, por lo general, se incorpora a la agarosa (0.5 mg/ml) antes de permitir la solidificación, o puede incorporarse luego del corrimiento, incubando el gel en una solución que lo contenga a 0.5 mg/ml. El bromuro de etidio fluorece de color naranja cuando se expone a la luz ultravioleta (longitud de

Figura 12-11. Fuente de poder. La imagen muestra una típica fuente de poder donde se indica el miliamperaje a que está siendo corrida la muestra. La selección de las condiciones de corrimiento puede ser con un amperaje constante o bien a voltaje constante, como en este caso.

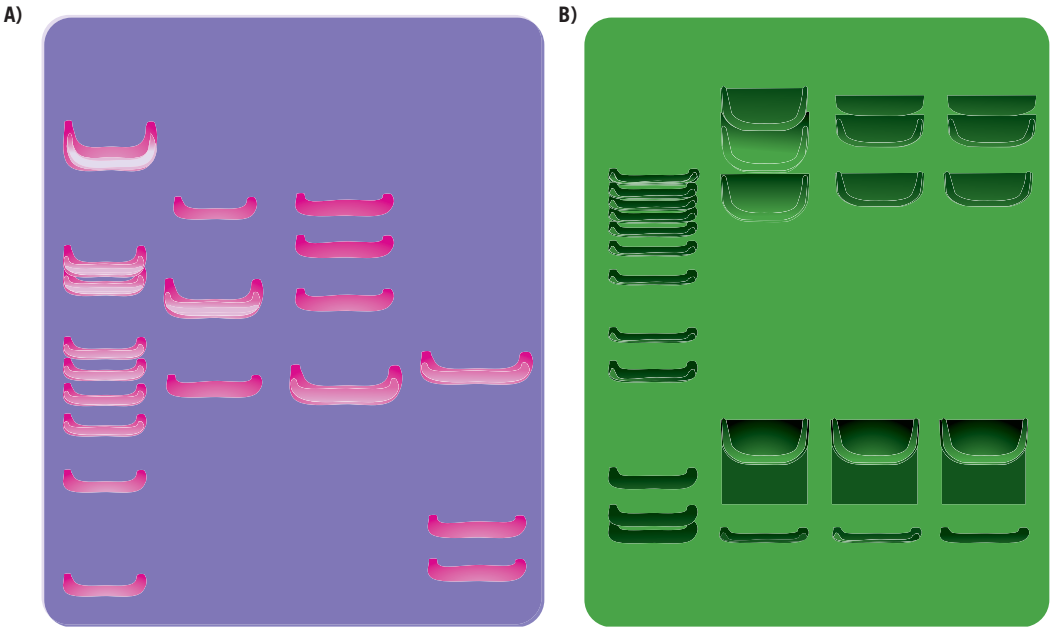


Figura 12-12. Visualización de fragmentos de ADN. Estas fotografías son de un gel de agarosa donde la muestra fue visualizada por **A)** bromuro de etidio, y **B)** Syber®-Green.

absorción de 254 nm, con longitud de emisión de 366 nm). La señal fluorescente es proporcional a la cantidad de producto, como puede observarse en la figura 12-10. Su sensibilidad permite detectar aproximadamente 30 pg de ácido nucleico por banda (según el grosor del gel). El bromuro de etidio es teratogénico, mutagénico y cancerígeno, por lo que para este procedimiento se recomienda el uso de guantes. En la actualidad, el bromuro de etidio se ha sustituido por un compuesto comercial, SYBR® Safe, que se une de manera no covalente a los ácidos nucleicos. Este colorante tiene una fluorescencia a 280, una excitación máxima a 502 nm y una emisión máxima a 530 nm. Con este colorante, el ADN puede visualizarse con una luz ultravioleta en el rango de 470 a 530 nm. Por otro lado, el SYBR®-Green es un fluoróforo que se une con gran afinidad al surco menor del ADN bicatenario, y es unas 25 veces más fluorescente que el bromuro de etidio. SYBR®-Green con epiiluminación de 254 nm puede detectar 60 pg de dsADN/banda; 1–2 ng de oligonucleótidos, y 100 a 300 pg de ARN o ssADN/banda. Para los geles de acrilamida una alternativa al bromuro de etidio es el nitrato de plata; sin embargo, éste utiliza reactivos peligrosos, como el formaldehído. Por otro lado, la tinción con plata es más sensible que el bromuro de etidio, más barata a largo plazo y menos tóxica. En la figura 12-12 se aprecia una muestra visualizada por bromuro de etidio y otra por SYBR® Safe.

Electroforesis de proteínas

El método más empleado para electroforesis de proteínas se lleva a cabo en un sistema discontinuo; es decir, un gel conformado por dos geles de poliacrilamida (uno de resolución y otro de compactamiento), que difieren en su concentración, composición y pH. Los geles están unidos pero limitados por una fase de separación visible a contra luz; para lograrlo deben prepararse por separado esperando la polimerización total del primero, para continuar con la del segundo; de lo contrario, en estado líquido, se mezclarían.

Cabe recordar que en el caso de los geles de acrilamida para ácidos nucleicos sólo se tiene una fase, conformada por el gel de resolución, donde las moléculas de ADN migrarán, generando un patrón electroforético, según su tamaño.

Para electroforesis de proteínas, la acrilamida se prepara a partir de una solución al 30% de acrilamida-bisacrilamida 19:1. Ésta se mezcla con el *buffer* correspondiente y una solución de SDS; además, se añade persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) como polimerizadores en concentraciones del orden de 1 a 10 mM. El APS genera radicales libres, por lo que es un iniciador de la reacción de polimerización que finalmente forma el gel. El TEMED funciona como otro iniciador de polimerización. Las propiedades del gel resultante dependen de la concentración de APS y TEMED, ya que un aumento en su concentración disminuye la longitud media de la cadena de polímero y, por lo tanto, disminuye su elasticidad y le resta transparencia al gel. Por ello, debe utilizarse la menor concentración posible de catalizadores que permita la polimerización en un tiempo óptimo.

El gel de acrilamida se forma entre dos vidrios, y el sistema completo se sumerge en el *buffer* de corrimiento dentro de la cámara vertical de electroforesis. En el momento de sumergir los geles en el tanque, se debe de asegurar que los pocillos del gel estén totalmente cubiertos por el *buffer*. Es

común en los geles de acrilamida realizar un precorrimiento de unos 10 a 30 minutos a voltajes bajos, con el cual se asegura que los pocillos se *limpien* antes de cargar las muestras.

Para la preparación de la muestra de proteína, se realiza una reacción fisicoquímica, en la que se rompen enlaces peptídicos y puentes disulfuro por acción de detergentes iónicos (SDS), reactivos reductores (beta-mercaptoetanol) y temperaturas elevadas (95°C), que al final consigue desnaturalizar la proteína hasta su estructura primaria. La muestra mezclada con el *buffer* de carga se deposita con cuidado en los pocillos, evitando la contaminación del pocillo contiguo. Hay que considerar el uso de un marcador estándar de proteínas para la medición del peso molecular de la muestra, que debe someterse a los mismos tratamientos que la proteína, excepto cuando se trate de un marcador previamente teñido, en que el que se obviará el uso del *buffer* de carga.

Una vez colocadas las muestras de proteínas en cada pocillo del gel, se conectan los cables correspondientes de los electrodos a la fuente de energía, con la selección de voltaje o amperaje adecuados. Para el cálculo del voltaje es importante conocer la distancia en centímetros del gel desde la parte superior hasta la parte inferior. La distancia multiplicada por 8-15 V permitirá determinar el voltaje del corrimiento. El voltaje óptimo dependerá de la molécula que se piensa separar; en consecuencia, se recomienda estandarizar este procedimiento. El valor del amperaje o corriente eléctrica (medida en amperios o miliamperios) dependerá de la fuerza iónica del *buffer*. En el caso de trabajar con *buffer* Tris-SDS-glicina, el valor recomendado es de 25 a 30 mA. La electroforesis se realiza hasta que el colorante, visualizado como una línea azul, haya llegado a los límites de la parte inferior del gel.

Visualización de las muestras

Si se requiere, el gel se sumerge en un recipiente conteniendo el colorante azul brillante de Coomasie y se incuba por unos minutos, lo que permitirá la visualización de las bandas de proteínas. El proceso de coloración se basa en la atracción electrostática del enlace peptídico de las proteínas sobre grupos de ácido sulfónico, que tiñen la proteína de color azul. Asimismo, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas participan en este proceso de unión mecánica. La tinción de Coomassie Blue clásica, normalmente puede detectar bandas de proteína de 50 ng, mientras que la tinción con plata incrementa este límite de sensibilidad unas 50 veces. La tinción con plata consiste en desarrollar el color en el gel por incubación en soluciones de metano al l40%: ácido acético al 10%, luego metanolal 40%, seguido de agua y posteriormente tiosulfato de sodio al 0.01%. Después de este proceso se lava y se procede a la incubación en frío (4°C) en cloruro de plata al 0.1%; posteriormente, se lava e incuba con carbonato de sodio al 2% en formalina al 0.04% (llamada también formol al 35%), que actúa como revelador. Por último, se incuba con soluciones de ácido acético antes de fotografiar o escanear.

Muchas variables pueden influir en la intensidad del color y todas las proteínas tienen características distintas de tinción.

Algunas veces, el gel se seca para conservarlo. Para ello, primero se deshidrata en glicerol-metanol y, posteriormente, se coloca en una lámina de celofán hidrofílico y no plastificado que cubra totalmente el gel. Se cubre el gel con un segundo celofán previamente remojado en agua y se sella con calor. Aquí se deja secar en condiciones ambientales por aproximadamente dos días o se acelera el proceso con el uso de desecadores de geles.

Algunas proteínas pueden migrar anómalamente y aparecer con un peso molecular mayor que el esperado; esto puede deberse a que presentan modificaciones postraduccionales en su estructura, como residuos de glicosilación, fosforilación y acetilación, que podrían retardar la migración de las muestras. Asimismo, si existe desnaturalización de las proteínas, se considera que la proteína está degradada y suelen aparecer manchas difusas en todo el carril.

Aplicaciones de la electroforesis

Algunos de los usos de la electroforesis para ácidos nucleicos en geles de agarosa son determinar los tamaños moleculares de los ácidos nucleicos, analizar los fragmentos cortados con enzimas de restricción (mapa de restricción), comparar los tamaños de distintos tipos de ADN, aislar y recuperar fragmentos de ADN purificados para clonaciones moleculares, y analizar productos de PCR, entre otros. Asimismo, la electroforesis puede ser un proceso previo a las técnicas de hibridación, como el Southern blot (ADN) o el Northern blot (ARN), donde la presencia de determinada secuencia del ácido nucleico en una mezcla de moléculas se distingue por su tamaño, la cual se confirma por hibridación con una sonda específica. En el caso de las proteínas, la electroforesis se aplica para la identificación de fracciones proteicas o proteínas particulares por tamaño, como es el caso de la electroforesis de globulinas, o proteínas séricas; pero, sobre todo, para la identificación de moléculas particulares empleando posteriormente una reacción antígeno-anticuerpo específica en la técnica de Western blot. Asimismo, la electroforesis es crucial en técnicas como la secuenciación, donde tras un corrimiento electroforético de las cuatro reacciones de elongación con los dideoxinucleótidos (véase el capítulo 17, Secuenciación), se puede deducir la secuencia del segmento de ácido nucleico. Inclusive, los secuenciadores automáticos modernos emplean una electroforesis capilar para el discernimiento de la secuencia. También, los termocicladores en tiempo real basan la detección de los fragmentos amplificados en una electroforesis capilar, donde es posible la detección inmediata de los segmentos amplificados y su lectura por el láser correspondiente al flurocromo con que el producto está marcado.

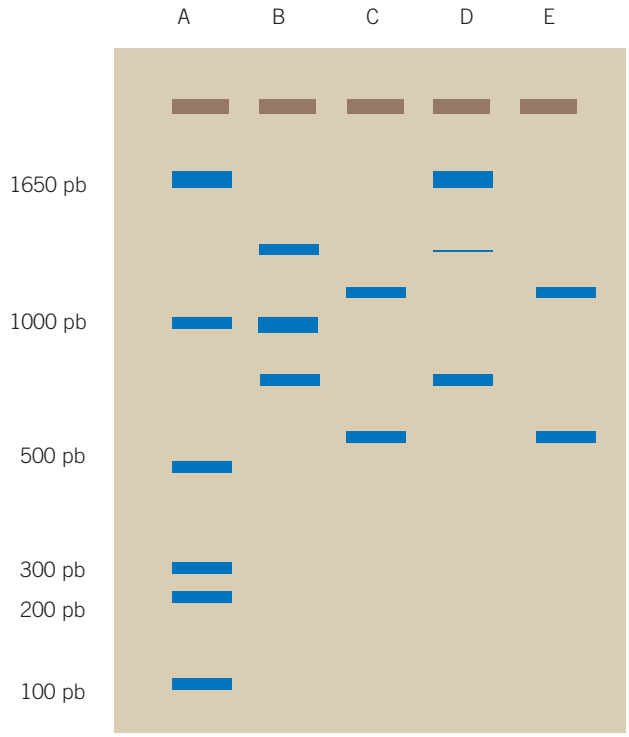


Figura 12-13.

Ejercicios de integración

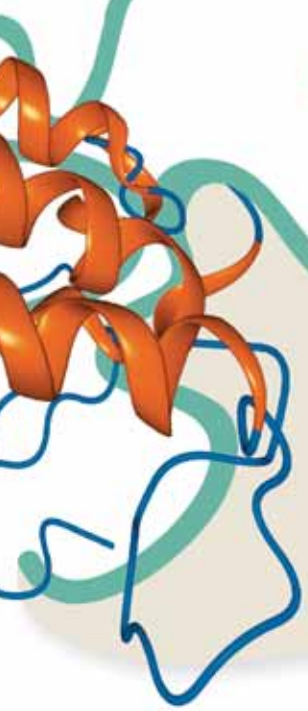
Basándose en la imagen de una electroforesis de agarosa para fragmentos de ADN representada en la imagen, indique:

1. De qué peso molecular es la banda de menor tamaño del carril C.
2. De qué peso molecular es la banda de mayor tamaño del carril D.
3. En qué carril y qué peso molecular presenta la banda que tiene mayor concentración.
4. En qué carril y qué peso tiene la banda de menor concentración.
5. Suponiendo que son muestras de ADN digeridas por enzimas de restricción, qué carriles contienen aparentemente la misma muestra. Explique su respuesta.
6. En qué carril se localiza el marcador de peso molecular.
7. El sentido de corrimiento de las muestras con una flecha.
8. La polaridad correspondiente a cada extremo del gel.

Bibliografía

Guo Y., Li X., Fang Y. The effects of electroendosmosis in agarose electrophoresis. *Electrophoresis,* 1998;19:1311-1213.

Sambrook J., Russell D.W. Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarose gel electrophoresis. En: *Molecular cloning a laboratory manual,* 3ª ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.



Capítulo 13

Enzimas de restricción

Jaime González Cuevas / Miriam Ruth Bueno Topete

Introducción

El descubrimiento, la caracterización y el aislamiento de los diferentes tipos de enzimas ha facilitado en la investigación las tareas del estudio de los genomas así como su expresión, su regulación y su posterior correlación con el desarrollo de diversas enfermedades. Hoy por hoy es común la aplicación de técnicas de biología molecular en diversas áreas, y en particular en las ciencias de la salud, ya que han revolucionado los métodos analíticos generando gran impacto en la investigación básica y la clínica, especialmente en el diagnóstico de enfermedades.

Las enzimas de restricción son una herramienta primordial para la ejecución de diversos ensayos útiles en investigación clínica, desde la determinación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), así como en la construcción de vectores con ADN recombinante y clonación de secuencias de ADN provenientes de humano, virus, bacterias y demás microorganismos de interés para la generación de conocimiento o para su aplicación en el área de la medicina. Entre las enzimas que modifican los ácidos nucleicos se encuentran las nucleasas, es decir, aquellas capaces de cortar los enlaces fosfodiéster que unen los nucleótidos de una cadena de ácidos nucleicos. Las nucleasas se denominan *endonucleasas* si son capaces de cortar el enlace fosfodiéster en nucleótidos localizados dentro de la cadena del ácido nucleico, y reciben el nombre de *exonucleasas* si cortan los enlaces fosfodiéster de los nucleótidos en los extremos de las cadenas. Así, existen 3'exonucleasas las que escinden enlaces en el extremo 3' de la cadena, y 5'exonucleasas que rompen enlaces fosfodiéster en el extremo 5' de la cadena.

Las enzimas de restricción presentan actividad endonucleasa, son de origen bacteriano y cortan los enlaces fosfodiéster del ADN en una secuencia específica denominada *secuencia diana*. El uso de estas enzimas como herramienta biotecnológica surgió de la necesidad de cortar las largas cadenas de ADN genómico para manipularse y analizarse en fragmentos más pequeños. El empleo de las enzimas de restricción y otras enzimas que modifican ácidos nucleicos, como la ligasa, permitió desarrollar la metodología del ADN recombinante.

En 1960, Stewart Linny y Werner Arber aislaron, en *E. coli*, enzimas que metilaban moléculas de ADN y que además cortaban un enlace fosfodiéster del ADN no metilado. Más tarde, en 1970, se caracterizó la primera nucleasa de restricción por Daniel Nathans Hamilton Smith, aislada de *Haemophilus influenzae*, denominada Hind I. En la actualidad, se sabe que todas las especies de bacterias sintetizan uno o más tipos de endonucleasas capaces de hacer cortes en secuencias específicas de nucleótidos de una doble cadena de ADN exógeno; generalmente, este ADN "extraño" es el proveniente de los bacteriófagos, virus con capacidad de infectar a dichas bacterias.

Estas endonucleasas se denominan *enzimas de restricción* debido a que restringen la permanencia de un ADN exógeno en la célula bacteriana que produce dicha enzima. Las enzimas de restricción empleadas con más frecuencia en la metodología del ADN recombinante suelen reconocer una secuencia única de 4 a 8 nucleótidos, donde realizan el corte.

Origen de las enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción forman parte de la maquinaria con la que cuenta la bacteria para defenderse de infecciones virales. El ADN de la bacteria que produce la enzima de restricción no se ve afectado por su propia enzima, ya que las bacterias metilan determinadas secuencias a su propio ADN para diferenciarlo del ADN viral por medio de

Cuadro 13-1. Características de las enzimas de restricción tipo III.

Tipo de enzima	Gasto energético	Sitio de corte en el ADN	Actividad de metilasa
I	ATP	*Aleatorio*, fuera de la secuencia diana.	Sí
II		*Específico*, en la secuencia diana.	No
III	ATP	*Aleatorio*, 25 a 27 pares de bases corriente abajo de la secuencia diana.	Sí

una enzima metiltransferasa en bases específicas, que generalmente son las reconocidas por sus propias enzimas de restricción.

Nomenclatura

Por acuerdo internacional, la nomenclatura de las enzimas de restricción se asigna según su origen bacteriano y se define basándose en las siguientes reglas:

1. Tres letras en cursiva que corresponden al nombre científico de la bacteria de donde fue atraída (p. ej., *Escherichia coli* (*Eco*); *Haemophilus influenzae* (*Hin*), etc.). La primera letra, en mayúscula, corresponde al género; las otras dos, a la especie.
2. La cepa o estirpe, si la hubiese (p. ej., EcoR, aislada de la cepa "RY13" de *E. coli*).
3. En números romanos, un número para distinguir si hay más de una endonucleasa aislada de esa misma especie (p. ej., EcoRI, EcoRV).
4. Todas deberían indicar con una "R" por *restricción* o una "M" por *metilasa*, según la función de la enzima, pero generalmente se omite.

Por ejemplo:

Hind III:
H = genero *Haemophilus*.
in = especie *influenzae*.
d = cepa DSM 11121.
III = tercera endonucleasa aislada en este organismo.

Eco RI:
E = género *Escherichia*.
co = especie *coli*.
R = cepa RV 13.
I = primera endonucleasa aislada de esta cepa.

Clasificación de enzimas de restricción

De acuerdo a su función las enzimas de restricción se han clasificado en tipo I, II, III.

Tipo I

Las enzimas que pertenecen a este grupo reconocen una secuencia específica de nucleótidos y hacen un corte aleatorio en la doble cadena en cualquier secuencia del ADN y a una distancia aproximada de 1000 pb del sitio de corte; además tienen la función de metilar su propio genoma. Estas enzimas necesitan adenosín trifosfato (ATP) para moverse a lo largo de la molécula de ADN desde el lugar de reconocimiento hasta el sitio de corte.

Tipo II

Son enzimas que reconocen secuencias específicas y hacen el corte de la doble cadena de ADN en el mismo sitio de reconocimiento. Estas enzimas sólo tienen actividad de restricción no de metilación y son las utilizadas en ingeniería genética, ya que cortan el ADN en secuencias específicas reconocidas. Requieren Mg^{2+} como cofactor y no requieren de ADN. Las secuencias de reconocimiento de estas enzimas son palindrómicas, es decir, son secuencias que se leen igual en las dos cadenas de ADN. Por ejemplo: Por ejemplo:

5' GGATCC 3'GATCC 3'
3' CCTAGG 5'CCTAGG 5'

Tipo III

Estas enzimas reconocen una secuencia específica y cortan el ADN de doble cadena fuera de la secuencia diana (aproximadamente de 25 a 27 pares de bases corriente abajo del sitio de reconocimiento). Tienen, al igual de las de tipo I, actividad de metilasa y requieren de ATP para desplazarse a lo largo de la molécula de ADN. Las características de los diferentes tipos de enzimas, de restriccioón se resumen en el cuadro 13-1.

Aplicaciones de las enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son una herramienta básica en clonación e ingeniería genética; se utilizan, entre otros fines, para hacer mapas de restricción de plásmidos o genomas. Un mapa de restricción se define como la serie de fragmentos que se generan por el corte con determinada(s) enzima(s), específicos en tamaño (y secuencia) y que permiten emplearlos para la caracterización de dicho ADN. Esta herramienta es sumamente importante para la clonación con vectores. También, en estudios de determinación de polimorfismos, como la técnica de RFLP , según se presente o no el sitio de corte de una enzima de restricción, se puede establecer la variante alélica, ya que el peso molecular del fragmento o fragmentos de ADN generado(s) permitirá la caracterización de la secuencia. Asimismo, la construcción de moléculas de ADN recombinante implica el obvio empleo de las enzimas de restricción para definir y delimitar las secuencias que se insertarán en el constructo recombinante. De la misma manera, el corte de ADN genó-

Cuadro 13-2. Cortes cohesivos.

Enzima	Bacteria origen	Secuencia de reconocimiento	Productos del corte
*Eco*RI	*Escherichia coli*	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
*Hin*dIII	*Haemophilus influenzae*	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
*Taq*I	*Thermus aquaticus*	5'TCGA 3'AGCT	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
*Not*I	*Nocardia otitidis*	5'GCGGCCGC 3'CGCCGGCG	5'---GC GGCCGC---3' 3'---CGCCGG CG---5'
*Hin*fI	*Haemophilus influenzae*	5'GANTC 3'CTNAG	5'---G ANTC---3' 3'---CTNA G---5'
*Sau*3A	*Staphylococcus aureus*	5'GATC 3'CTAG	5'--- GATC---3' 3'---CTAG ---5'
*Pov*II	*Proteus vulgaris*	5'CAGCTG 3'GTCGAC	5'---CAG CTG---3' 3'---GTC GAC---5
*Sma*I	*Serratia marcescens*	5'CCCGGG 3'GGGCCC	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'
*Hae*III	*Haemophilus egytius*	5'GGCC 3'CCGG	5'---GG CC---3' 3'---CC GG---5'
*Alu*I	*Arthrobacter luteus*	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'
*Eco*RV	*Escherichia coli*	5'GATATC 3'CTATAG	5'---GAT ATC---3' 3'---CTA TAG---5'
*Kpn*I	*Klebsiella pneumonia*	5'GGTACC 3'CCATGG	5'---GGTAC C---3' 3'---C CATGG---5'
*Pst*I	*Providencia stuartii*	5'CTGCAG 3'GACGTC	5'---CTGCA G---3' 3'---G ACGTC---5
*Sac*I	*Streptomyces achromogenes*	5'GAGCTC 3'CTCGAG	5'---GAGCT C---3' 3'---C TCGAG---5'
*Sal*I	*Streptomyces albue*	5'GTCGAC 3'CAGCTG	5'---G TCGAC---3' 3'---CAGCT G---5'
*Sph*I	*Streptomyces phaeochromogenes*	5'GCATGC 3'CGTACG	5'---G CATGC---3' 3'---CGTAC G---5'
*Xba*I	*Xanthomonas badrii*	5'TCTAGA 3'AGATCT	5'---T CTAGA---3' 3'---AGATC T---5'

mico que suele ser, según el organismo, del orden de millones de pb, es más manipulable cuando es digerido por estas enzimas en fragmentos más pequeños. Esto permite un manejo adecuados sin el riesgo de degradacióny manipulación lación para la construcción de bibliotecas genómicas, que se discuten en el capítulo de vectores de clonación.

Tipos de cortes producidos por las enzimas de restricción

Los cortes que realizan las enzimas de restricción sobre la cadena de ADN pueden generar dos estructuras o formas: cohesivas o romas. Los cortes cohesivos, también llamados pegajosos, se generan porque la enzima corta en cada cadena de ADN entre nucleótidos localizados en posiciones diferentes respecto al eje de simetría de la secuencia de diana. Estos cortes generan extremos monocatenarios en un segmento de 3 a 5 bases de longitud, por lo que en esta fracción la falta de cadena complementaria facilita su interacción con otro fragmento en monocadena con secuencia complementaria, como se muestra en el cuadro 13-2. Los extremos así generados propician la unión específica entre segmentos diferentes de ADN, pero cortados por la misma enzima, lo que origina condiciones idóneas de unión específica para la producción de ADN recombinante. Los extremos romos se generan porque la enzima corta en ambas cadenas de ADN sobre un mismo eje, por lo que dichos extremos son de doble cadena, y la unión entre fragmentos de ADN con extremos romos es más inespecífica, ya que no depende de la complementariedad de regiones monocadena. En la figura 13-1 se muestran las enzimas que generan extremos cohesivos o pegajosos (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*), y en la figura 13-2 las enzimas que generan extremos romos (*SspI, SmaI*).

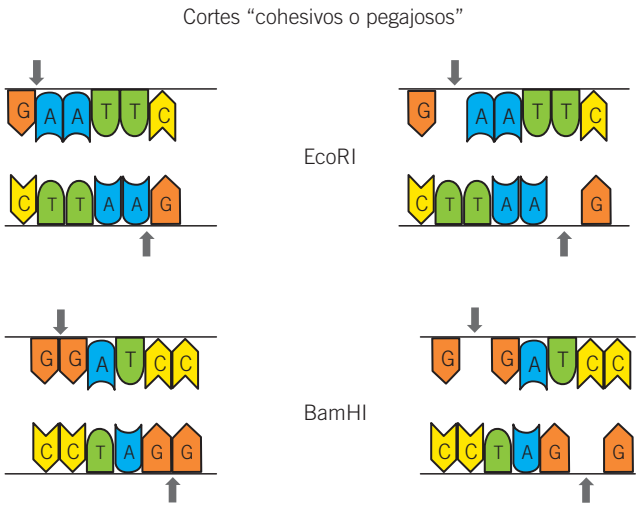


Figura 13-1. Cortes cohesivos o pegajosos.

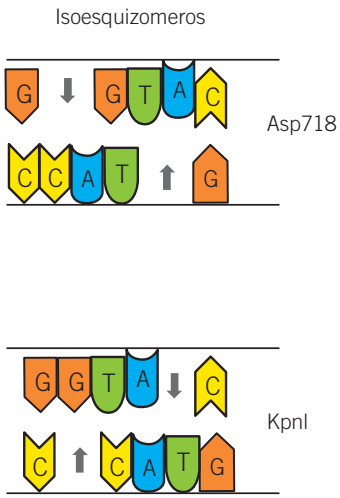


Figura 13-3. Isoesquizomeros.

Isoesquizómeros

Se denomina isoesquizómeros a las enzimas de restricción obtenidas de diferente especie bacteriana pero que reconocen la misma secuencia diana de ADN y cortan entre diferentes nucleótidos de dicha secuencia (por ejemplo, *Asp*718 y *Kpn*I). Ambas reconocen la secuencia 5´GGTAC3´ pero *ASp*718 corta el enlace entre GG mientras *Kpn*I corta entre los nucleótidos AC, como se describe en la figura 13-3.

Familias de enzimas de restricción

Una familia de enzimas de restricción está formada por aquellas que no necesariamente reconocen la misma secuencia diana, pero producen extremos cohesivos similares. Un ejemplo de familia es: *BamH*I y *Bcl*II, que reconocen las secuencias diana 5'GGATCC3' y 5'AGATCT3', respectivamente, pero que generan extremos cohesivos idénticos: 5'GATC3'.

BamH I:	5'---G	GATCC---3'
	3'---CCTAG	G---5'
Bgl II:	5'---A	GATCT---3'
	3'---TCTAG	C---5'

Esta característica favorece que dos fragmentos cortados con estas enzimas puedan recombinarse de manera específica gracias a la complementariedad de sus bases en los extremos cohesivos generados, como se muestra en la figura 13-4.

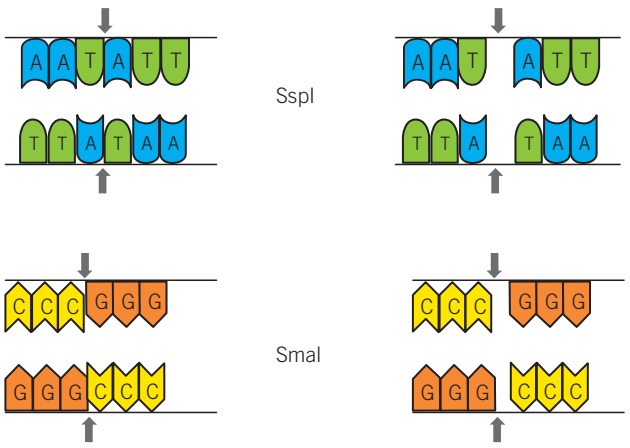


Figura 13-2. Cortes romos.

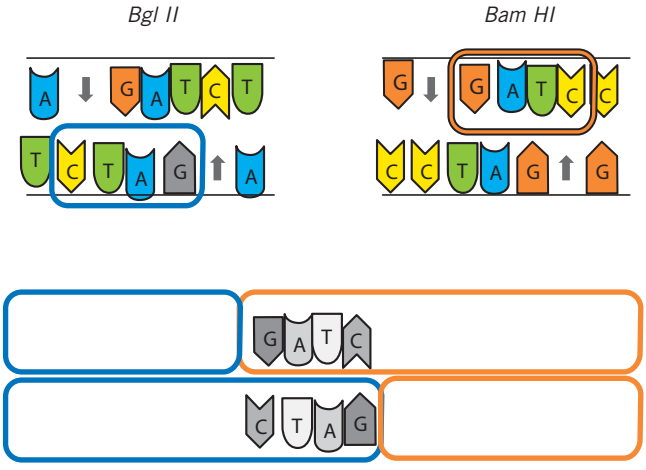


Figura 13-4. Familias de enzimas.

Factores que afectan la actividad de las enzimas de restricción

Entre los factores que más afectan la actividad de las enzimas de restricción se encuentran:

- La pureza biológica del ADN. Contaminación de la muestra con otros ADN impide el buen funcionamiento de las enzimas.
- Los contaminantes como detergentes y estabilizadores (docedil sulfato de sodio –SDS–, ácido etilendiaminotetraacético –EDTA–), ya que concentraciones elevadas de sales y detergentes inhiben la actividad enzimática.
- Modificaciones en el pH y temperatura de incubación. Variaciones leves en estos parámetros inhiben enormemente la actividad de las enzimas.
- El grado de metilación del ADN, ya que algunas enzimas son inhibidas por metilación en ciertas secuencias.

Condiciones de almacenamiento y conservación de las enzimas de restricción

Las enzimas de restricción, al igual que muchas otras proteínas, pueden disminuir su vida media y en consecuencia su actividad, al ser conservadas y manejadas de forma inadecuada fuera de su rango ideal de temperatura; deben conservarse a -20ºC, así que para evitar su congelamiento y su consecuente pérdida de actividad son diluidas en un volumen determinado de glicerol. Para usarlas se requiere un contenedor que asegure la menor variación de temperatura posible.

Selección de la enzima de restricción adecuada

Todos los organismos cuentan con un mapa de restricción que indica la posición donde se encuentran los sitios de corte para muchas de las enzimas conocidas. Cuando se pretende realizar el corte en un plásmido conocido o comercial, por ejemplo, se revisa el mapa de restricción, el cual ofrece un listado en orden alfabético de las enzimas que son capaces de cortar dicho ADN, el sitio de corte, el tipo de corte, así como el número y tamaño de cada fragmento generado. En el caso del ADN genómico es necesario conocer la secuencia completa con la que se va a trabajar para conocer los sitios de corte y predecir el número y tamaño de los fragmentos. Se realiza ingresando dicha secuencia a una base de datos especializada para estudios de restricción y, de esta manera, se obtiene un listado de las posibles enzimas que reconocen la secuencia diana. Se elige la enzima tomando en cuenta las características experimentales ajustándose al objetivo perseguido.

Eficiencia en el uso de las enzimas de restricción

Las hojas de instrucciones o insertos que facilita el proveedor incluyen las características y descripción de las condiciones óptimas de actividad de las enzimas de restricción disponibles comercialmente. Dichas condiciones están ajustadas para el volumen de reacción requerido, de acuerdo a la tecnología que se requiere aplicar. Se debe tener en cuenta la temperatura óptima de acción, presentación comercial de la enzima (unidades de enzima por microlitro), tiempo de incubación, así como los posibles requerimientos de aditivos, como albúmina, ATP, etcétera.

Cantidad de enzima adecuada para un ensayo

La cantidad de enzima utilizada en una reacción dependerá de la concentración de ADN en la muestra a digerir. La concentración de la enzima está descrita en la hoja de instrucciones del proveedor, como unidades por microlitro (u/µl). Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima requerida para producir la digestión completa de un microgramo de ADN sustrato en 60 minutos a la temperatura óptima de acción de la enzima. El tiempo de incubación de la reacción puede ser incrementado si la enzima utilizada está cerca de su fecha de caducidad y su actividad está mermando. Sin embargo, el tiempo no debe incrementarse demasiado, pues aunque el ADN es una molécula resistente, se corre el riesgo de su degradación.

Preguntas de repaso

1. ¿Cuáles son las condiciones de almacén y conservación de las enzimas de restricción?
2. ¿Cómo se determina la enzima de restricción ideal para realizar un corte en una secuencia específica de ADN?
3. ¿Cómo se logra la mayor eficiencia en la actividad de las enzimas de restricción?
4. ¿Cómo se determina la cantidad de enzima de restricción para un ensayo?
5. ¿Aumenta la eficiencia de la actividad de restricción si se rebasa el tiempo recomendado de incubación?

Ejercicios de integración

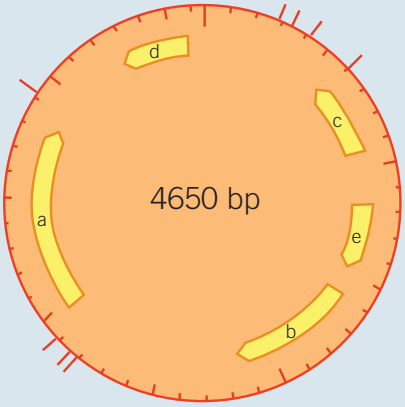
Instrucciones: A continuación se presenta la secuencia de ADN de un plásmido que consta de 4650 pares de bases.

1. Identifique los sitios de restricción en la cadena en base a la secuencia de nucleótidos de las siguientes enzimas de restricción.

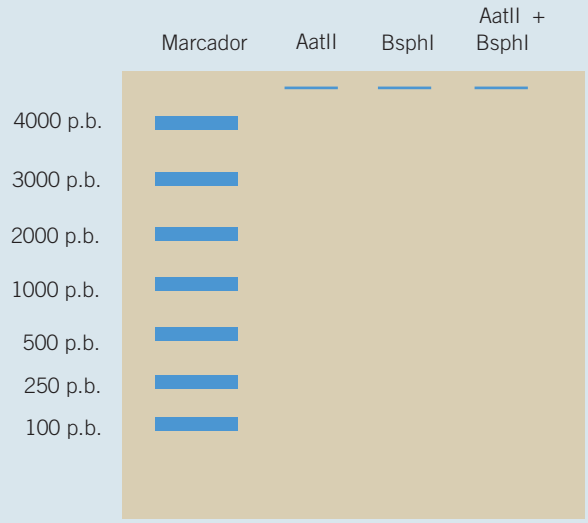
***AatII*: 5' G A C G T--C 3'**
***BspHI*: 5' T--C A T G A 3'**

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CGGGCAAAG
51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCG GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCC TGCGGCCGCA
151 CGCGTGGAGC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT
201 AGCCCATATA TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC
251 TGGCTGACCG CCCAACGACC CCCGCCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG
301 TTCCCATAGT AACGTCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG
351 TATTTACGGT AAACTGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC
401 AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
451 ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC
501 GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA
551 TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA
601 TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGCACCA AAATCAACGG GACTTTCCAA
651 AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA
701 CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTCGT TTAGTGAACC GTCAGATCGC
751 CTGGAGACGC CATCCACGCT GTTTTGACCT CCATAGAAGA CACCGGGACC
801 GATCCAGCCT CCGCGGATTC GAATCCCGGC CGGGAACGGT GCATTGGAAC
851 GCGGATTCCC CGTGCCAAGA GTGACGTAAG TACCGCCTAT AGAGTCTATA
901 GGCCCACAAA AAATGCTTTC TTCTTTTAAT ATACTTTTTT GTTTATCTTA
951 TTTCTAATAC TTTCCCTAAT CTCTTTCTTT CAGGGCAATA ATGATACAAT
1001 GTATCATGCC TCTTTGCACC ATTCTAAAGA ATAACAGTGA TAATTTCTGG
1051 GTTAAGGCAA TAGCAATATT TCTGCATATA AATATTTCTG CATATAAATT
1101 GTAACTGATG TAAGAGGTTT CATATTGCTA ATAGCAGCTA CAATCCAGCT
1151 ACCATTCTGC TTTTATTTTA TGGTTGGGAT AAGGCTGGAT TATTCTGAGT
1201 CCAAGCTAGG CCCTTTTGCT AATCATGTTC ATACCTCTTA TCTTCCTCCC
1251 ACAGCTCCTG GGCAACGTGC TGGTCTGTGT GCTGGCCCAT CACTTTGGCA
1301 AAGAATTGGG ATTCGAACAT CGATTGAATT CCCCGGGGAT CCTCTAGAGT
1351 CGACCTGCAG AAGCTTGCCT CGAGCAGCGC TGCTCGAGAG ATCTACGGGT
1401 GGCATCCCTG TGACCCCTCC CCAGTGCCTC TCCTGGCCCT GGAAGTTGCC
1451 ACTCCAGTGC CCACCAGCCT TGTCCTAATA AAATTAAGTT GCATCATTTT
1501 GTCTGACTAG GTGTCCTTCT ATAATATTAT GGGGTGGAGG GGGGTGGTAT
1551 GGAGCAAGGG GCAAGTTGGG AAGACAACCT GTAGGGCCTG CGGGGTCTAT
1601 TGGGAACCAA GCTGGAGTGC AGTGGCACAA TCTTGGCTCA CTGCAATCTC
1651 CGCCTCCTGG GTTCAAGCGA TTCTCCTGCC TCAGCCTCCC GAGTTGTTGG
1701 GATTCCAGGC ATGCATGACC AGGCTCAGCT AATTTTTGTT TTTTGGTAG
1751 AGACGGGGTT TCACCATATT GGCCAGGCTG GTCTCCAACT CCTAATCTCA
1801 GGTGATCTAC CCACCTTGGC CTCCCAAATT GCTGGGATTA CAGGCGTGAA
1851 CCACTGCTCC CTTCCCTGTC CTTCTGATTT TGTAGGTAAC CACGTGCGGA
1901 CCGAGCGGCC GCAGGAACCC CTAGTGATGG AGTTGGCCAC TCCCTCTCTG
1951 CGCGCTCGCT CGCTCACTGA GGCCGGGCGA CCAAAGGTCG CCCGACGCCC
2001 GGGCTTTGCC CGGGCGGCCT CAGTGAGCGA GCGAGCGCGC AGCTGCCTGC
2051 AGGGGCGCCT GATGCGGTAT TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CGGTATTTCA
2101 CACCGCATAC GTCAAAGCAA CCATAGTACG CGCCCTGTAG CGGCGCATTA
2151 AGCGCGGCGG GTGTGGTGGT TACGCGCAGC GTGACCGCTA CACTTGCCAG
2201 CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT TCGCTTTCTT CCCTTCCTTT CTCGCCACGT
2251 TCGCCGGCTT TCCCCGTCAA GCTCTAAATC GGGGGCTCCC TTTAGGGTTC
2301 CGATTTAGTG CTTTACGGCA CCTCGACCCC AAAAAACTTG ATTTGGGTGA
2351 TGGTTCACGT AGTGGGCCAT CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTTGA
2401 CGTTGGAGTC CACGTTCTTT AATAGTGGAC TCTTGTTCCA AACTGGAACA
2451 ACACTCAACC CTATCTCGGG CTATTCTTTT GATTTATAAG GGATTTTGCC
2501 GATTTCGGCC TATTGGTTAA AAAATGAGCT GATTTAACAA AAATTTAACG
2551 CGAATTTTAA CAAAATATTA ACGTTTACAA TTTTATGGTG CACTCTCAGT
2601 ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC
2651 ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA
2701 GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG
2751 TCATCACCGA AACGCGCGAG ACGAAAGGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT
2801 ATAGGTTAAT GTCATGATAA TAATGGTTTC TTAGACGTCA GGTGGCACTT
2851 TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAAATACAT
2901 TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCCTGATAAA TGCTTCAATA
2951 ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA
3001 TTCCCTTTTT TGCGGCATTT TGCCTTCCTG TTTTTGCTCA CCCAGAAACG
3051 CTGGTGAAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA
3101 CATCGAACTG GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG
3151 AAGAACGTTT TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG
3201 GTATTATCCC GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA
3251 CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC
3301 TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG
3351 AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA
3401 GGAGCTAACC GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG
3451 ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC
3501 ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAACTGG
3551 CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG
3601 CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG
3651 TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT
3701 TGCAGCACTG GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA
3751 CGACGGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG
3801 ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC
3851 ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACTTCA TTTTTAATTT AAAAGGATCT
3901 AGGTGAAGAT CCTTTTTGAT AATCTCATGA CCAAAATCCC TTAACGTGAG
3951 TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC
4001 TTGAGATCCT TTTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC
4051 CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT
4101 TTTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT
4151 TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC
4201 CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC
4251 GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA
4301 GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG
4351 AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA
4401 AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG
4451 CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT
4501 GGTATCTTTA TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA
4551 TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA
4601 CGCGGCCTTT TTACGGTTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT

2. En el siguiente esquema, determine los pares de bases de los fragmentos resultantes después del corte y complete el mapa de restricción del plásmido.



3. El corte con las siguientes enzimas de restricción genera fragmentos de ADN los cuales serán analizados mediante electroforesis en gel. Indique de manera aproximada de acuerdo a su peso molecular las bandas que estos segmentos de ADN generarían.



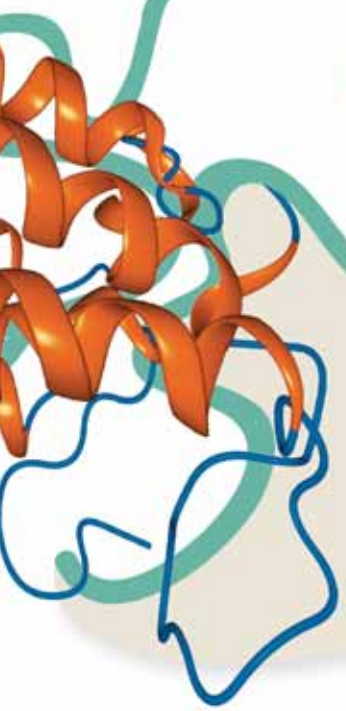
Bibliografía

Glick B.R., Pasternak J.J. *Molecular biotechnology, principles and applications of recombinant ADN,* 2ª ed. Washington: ASM Press, 1998.

Lewin B. *Genes VIII,* 8ª ed. Upper Saddle River, Nueva Jersey: Pearson/Prentice-Hall, 2004.

Nelson D., Cox M. *Lehninger Principles of Biochemistry,* 4ª ed. Nueva York: Freeman, 2005.

Smith C.A., Wood E.J. *Biología molecular y biotecnología.* México, DF: Addison Wesley Longman, 1998.



Capítulo 14

Vectores de clonación y expresión

Ana Soledad Sandoval Rodríguez / Mayra Mena Enríquez
Ana Laura Márquez Aguirre

Introducción

Hasta la década de 1970, el ADN era una molécula cuyo análisis era sumamente problemático, ya que era demasiado larga y estaba formada sólo por cuatro monómeros. En esa época la secuencia de nucleótidos del ADN sólo había podido estudiarse indirectamente a través de la secuencia de aminoácidos en las proteínas o por su expresión en el ARN. Por ello, el descubrimiento de las enzimas de restricción facilitó el estudio del ADN, ya que gracias a ellas fue posible seccionar moléculas grandes de ADN y separarlas en fragmentos. Cada uno de esos fragmentos se analizaba por separado y fue posible multiplicarlos a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véase el capítulo de PCR), e incluso determinar la secuencia de sus nucleótidos por secuenciación. Los procesos técnicos que forman parte de la metodología del ADN recombinante son, en gran parte, adaptaciones de procesos naturales de la genética microbiana o eucariota, mezclados con técnicas novedosas e ingeniosas. Gracias a la especificidad del reconocimiento de las secuencias que pueden ser cortadas por las enzimas de restricción ha sido posible la identificación, el aislamiento y la clonación de fragmentos de ADN provenientes de diferentes organismos, para producir moléculas de ADN recombinante. El termino *clonación*, *per se*, indica el acto de producir muchas copias idénticas de una molécula de ADN, y antes del advenimiento de la técnica de PCR era la manera usual de multiplicar una secuencia específica. En la actualidad, la clonación se emplea para la producción de moléculas recombinantes y para determinar sus funciones en el organismo. La célula que capta el ácido nucleico se denomina *célula transformada* y esta variación en su genoma es hereditaria.

Clonación

La clonación de ADN, o clonación molecular, es la introducción de un fragmento de ADN denominado ***inserto*** dentro de una molécula de ADN denominada ***vector,*** que puede replicarse de manera autónoma e independiente del genoma de la célula hospedera. El resultado es la obtención de millones de copias de una **molécula recombinante** o **clona molecular** compuesta por ADN proveniente del inserto y del vector.

El inserto puede ser ADN obtenido de cualquier organismo y puede permanecer como ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc), producto de la retrotranscipción del ARN, un producto de PCR o un ARN obtenido por transcripción *in vitro*.

Vectores de clonación

Un vector se define como una molécula de ADN de doble cadena (DNAds), con capacidad de albergar un fragmento de ADN exógeno (de otro origen).

Clasificación de vectores

De acuerdo con su uso, los vectores se clasifican en vectores de clonación y vectores de expresión.

Vectores de clonación

Los *vectores* son *de clonación* si su finalidad es el almacenamiento de secuencias y la obtención de grandes cantidades del ADN insertado o de la molécula recombinante. Los *vectores de clonación* suelen ser plásmidos, fagos, fagémidos, cósmidos y cromosomas artificiales bacterianos o de levadura.

Vectores de expresión

Los *vectores de expresión* son aquellos cuyo objetivo es producir un tránscrito (ARN) o la proteína producto de ese tránscrito. Los vectores de expresión pueden ser plásmidos o fagos (figura 14-1).

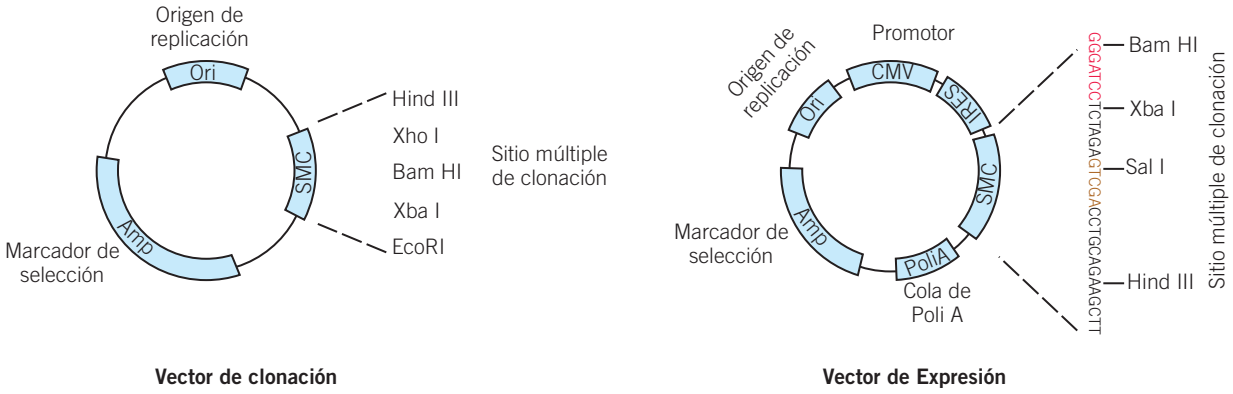


Figura 14-1. Vector de clonación y expresión. Un vector de clonación contiene elementos como el origen de replicación, un sitio múltiple de clonación (SMC), que es una secuencia específica reconocida por diversas enzimas de restricción para poder insertar el ADNc del gen de interés y un marcador de selección. Un vector de expresión se utiliza para producir una proteína recombinante y contiene, además de los elementos mencionados, un promotor y un sitio IRES (sitio de entrada interna al ribosoma), así como una secuencia de poliadenilación.

Elementos que forman un vector de clonación

Todos los vectores de clonación poseen, como parte de su estructura, los siguientes elementos básicos comunes:

a) *Origen de replicación:* es una secuencia en el ADN del vector que provee un sitio único de reconocimiento a las proteínas que identifican el sitio de inicio de la replicación (ORI). Los plásmidos se caracterizan por tener un solo sitio ORI en su genoma y realizar una replicación unidireccional.

b) *Marcador de selección:* es un gen que generalmente confiere resistencia a un antibiótico o genera un fenotipo particular con el cual puede seleccionarse la célula que incorporó el vector. En general, los marcadores de selección son únicos en los vectores, aunque existen algunos plásmidos que contienen dos. Entre los genes de selección más comunes se encuentran los de resistencia a ampicilina y kanamicina. Algunos vectores plasmídicos poseen un segundo marcador de selección, el gen *lacZ*, que se encuentra en el operón Lac de *E. coli* y codifica la enzima β-galactosidasa. Así, cuando el vector se replica dentro de la célula hospedera, la β-galactosidasa puede expresarse y generar una enzima funcional. Si la célula que contiene el vector se pone en contacto con un sustrato de la enzima, como el compuesto denominado X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactopiranósido), es degradada por la enzima, lo que produce un color azul que permite identificar a las células que introdujeron el vector. También existen marcadores, como el gen de la proteína verde fluorescente (*green fluorescente protein*, GFP) que permite que la célula transformada emitía fluorescencia cuando se expone a luz ultravioleta (figura 14-2).

c) *Sitio de clonación múltiple:* es un fragmento de ADN que contiene una serie de sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción, muy cercanos entre sí, con una amplia gama de posibilidades de insertar cualquier fragmento de ADN. Los sitios de restricción más comunes presentes en el sitio de clonación múltiple de la mayoría de los vectores son para las enzimas *Eco*R I, *Hin*d III, *Bam*H I, *Xho* I y *Kpn* I (ver la figura 14-1).

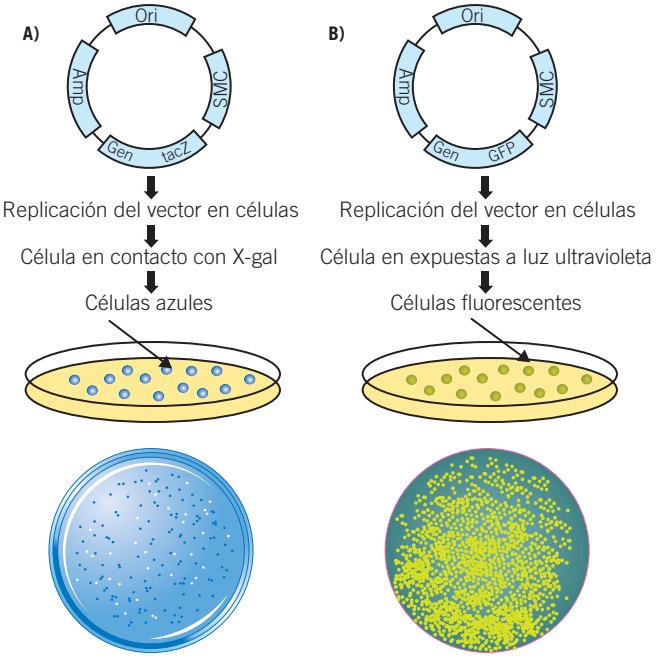


Figura 14-2. Marcadores de selección. A) El gen LacZ es un marcador de selección que codifica para la enzima β-galactosidasa. Cuando la célula que contiene el plásmido se pone en contacto con el reactivo x-gal, las colonias de células transformadas se tiñen de color azul. **B)** Otro marcador de selección es el gen *GFP*, que expresa la proteína verde fluorescente que proporciona fluorescencia a la colonia celular cuando es expuesta a la luz ultravioleta.

Cuadro 14-1. Características de los vectores de clonación.

Vectores de clonación utilizados		
Tipo de vector	**Método de introducción**	**Tamaño del inserto que se puede clonar**
Plásmidos	Transformación química o por electroporación. Las células se vuelven competentes para incorporar el plásmido recombinante.	15 000 pb
Bacteriófagos λ	Infección con fagos. Después del empaquetamiento *in vitro* del factor recombinante en partículas del fago.	23 000 pb
Cósmidos y cromosomas artificiales	Dependiendo del tamaño del inserto de ADN se puede utilizar cualquiera de los métodos anteriores. Fragmentos largos necesitan empaquetamiento en fagos I.	45 000 pb

Los vectores de clonación tienen características específicas que los hacen ideales para la clonación. Una de las características que se utilizan para la selección del vector de clonación es el tamaño del inserto que se quiera clonar. Los plásmidos aceptan insertos de 15000 pb, el bacteriófago lambda 23000 pb, los cósmidos 45000 pb y los cromosomas artificiales más de 45000 pb.

A continuación se detallan los vectores de clonación más utilizados, esquematizados en la figura 14-3; sus características se resumen en el cuadro 14-1.

Plásmidos

Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares de ADN que se replican y se transmiten con independencia del cromosoma bacteriano. De manera natural constituyen el material genético móvil de las bacterias, donde funcionan como medio de transporte de genes a otras bacterias, como la resistencia a antibióticos. Los plásmidos permanecen de manera episomal en la bacteria, esto es, sin incorporarse en su genoma, y en ella puede haber múltiples copias del mismo plásmido. Cuando una bacteria se reproduce, estos plásmidos se transmiten a las células descendientes por distribución equitativa del citoplasma bacteriano durante la división celular. Sin embargo, también pueden transmitirse a través de los *pili* entre las bacterias. La replicación y transcripción plasmídica depende de la maquinaria enzimática de la célula huésped.

Los plásmidos han sido manipulados genéticamente en el laboratorio con la finalidad de preservar sólo las características deseables, eliminar el ADN innecesario y añadirle otras que no poseen de forma natural. Los plásmidos usados como vector en general están formados por de 2 a 5 kb de ADN, lo que facilita el análisis de los insertos incorporados a él. Existen cientos de plásmidos disponibles comercialmente que ofrecen una amplia variedad de posibilidades en cuanto a las enzimas de restricción que se van a emplear para la clonación, la longitud del producto que se va a insertar y los marcadores de selección de las clonas transformadas. Entre los plásmidos más utilizados se encuentran pBlueescript, pUC19, pBR322 y pGLO.

Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan naturalmente bacterias y se comportan como parásitos intracelulares obligados que se multiplican haciendo uso de la maquinaria biosintética de las bacterias. Al igual que los plásmidos, los bacteriófagos se replican de forma autónoma, portan información genética y pueden conferirle a la bacteria nuevas propiedades o desarrollarle procesos patológicos.

Para convertirlo en un vector, el bacteriófago silvestre (virus natural) es modificado genéticamente. Dichas modificaciones consisten en la adición de sitios de restricción específicos y la eliminación de aquellos genes que no se requieren para la replicación, lo que permite la incorporación de fragmentos de ADN de mayor longitud que los plásmidos (de hasta 23 kb).

El bacteriófago lambda es el fago más utilizado como vector de clonación, y su genoma consiste de una molécula lineal de aproximadamente 45000 pb, cuyos extremos son 12 nucleótidos, que contienen secuencias complementarias entre sí, denominados **sitios cos**, que utiliza para "circularizar" su genoma a través de la acción de una ligasa de la célula huésped (ver la figura 14-3).

Cósmidos

Algunos estudios de análisis de ADN genómico requieren de la clonación de fragmentos de ADN grandes. En estos casos, es recomendable utilizar los cósmidos ya que pueden aceptar insertos de hasta 45 kb.

Los cósmidos son vectores híbridos del ADN de un plásmido (proporciona la resistencia a los antibióticos) y los sitios *cos* del bacteriófago (le permiten empaquetar el ADN). Los cósmidos derivados del fago P1 pueden admitir 85 kb de ADN exógeno. Además, contienen los genes de selección y un sitio ORI del plásmido, por lo que se replican de manera independiente del genoma bacteriano, como lo hacen los plásmidos.

Cromosomas artificiales

Fragmentos de ADN de mayor tamaño (cientos de kilobases) pueden clonarse en cromosomas artificiales de bacterias (**BAC**) o levadura (**YAC**), que se replican como un cromosoma independiente dentro de bacterias o levaduras, respectivamente. Este tipo de vectores son particularmente útiles para estudios de mapeo de cromosomas, por su capa-

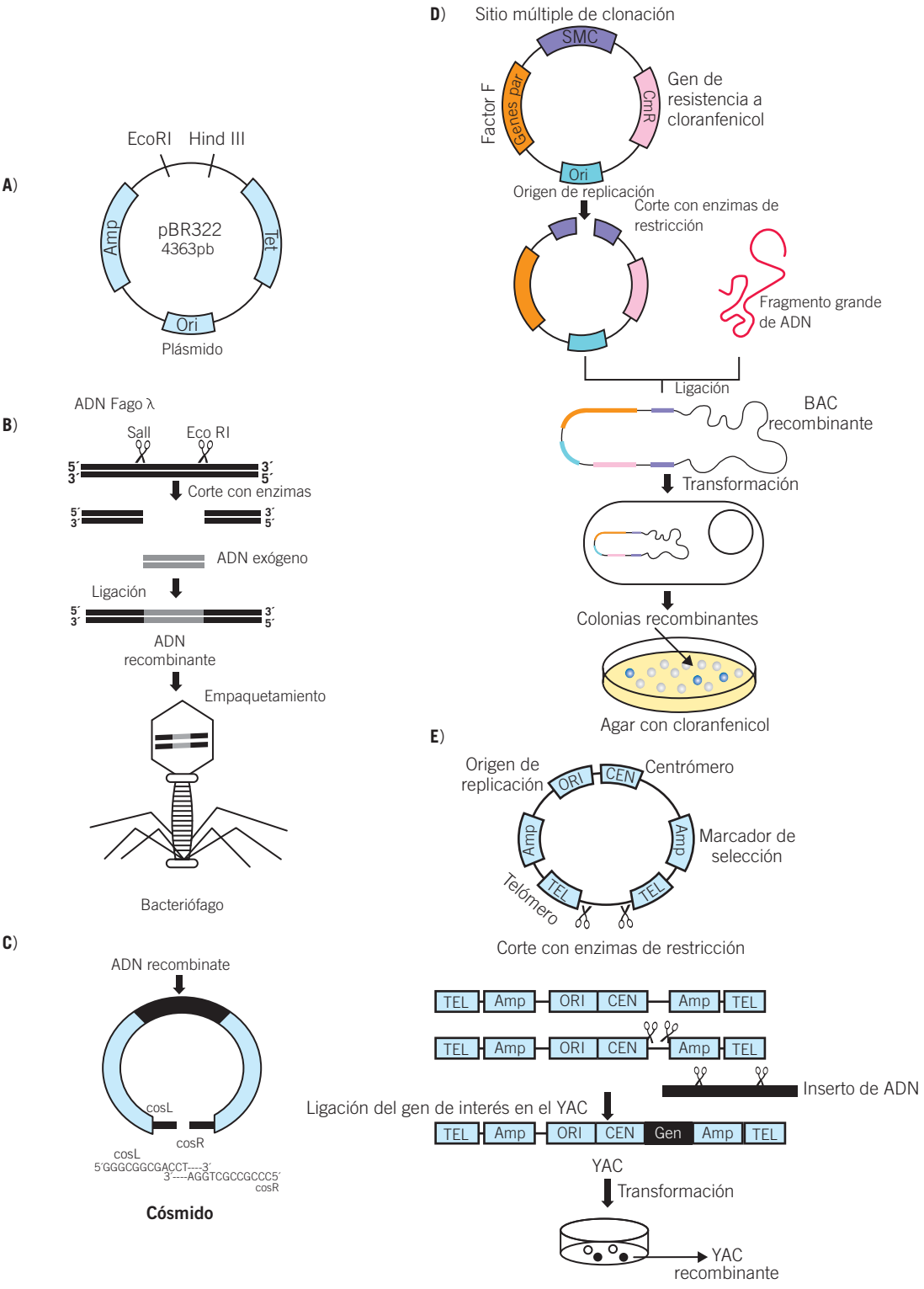


Figura 14-3. Vectores de clonación. Los vectores de clonación se han creado con la finalidad de contener y permitir la amplificación de fragmentos de ácidos nucleicos. **A)** Un plásmido consta de componentes básicos como el sitio de clonación múltiple, un gene de resistencia y un sitio ORI. **B)** Los fagos provienen de la modificación del genoma ADNds lineal de virus bacterianos. **C)** Los cósmidos, como su nombre indica, combinan propiedades de los plásmidos con la presencia de los sitios COS del fago. **D)** Un BAC, o cromosoma bacteriano, permite la ligación de fragmentos grandes de ADN que contienen secuencias de resistencia a antibióticos, y sitio de clonación múltiple. **E)** Los YAC se construyen a partir de la ligación de fragmentos de ADN de gran tamaño con genomas de levadura modificados que contienen genes de resistencia a antibióticos, secuencias teloméricas y de codificación para centrómeros.

cidad para almacenar fragmentos de gran tamaño. Un **BAC** es un constructo derivado del plásmido F (*functional fertility plasmid*) capaz de regular la distribución equitativa de plásmidos después de la división bacteriana. Usualmente, acepta insertos de 150 a 350 Kb, pero se han clonado segmentos de hasta 700 kb. Un sistema similar denominado *PAC,* derivado del plásmido bacterial P1, tiene capacidad de insertar hasta 300 kb.

Los **YAC** son cromosomas artificiales que contienen telómeros, origen de replicación, un centrómero de levadura y un marcador de selección para su identificación en las células que los contengan. Su capacidad de clonación es de 100 a 1 000 kb.

Vectores de expresión

Los vectores de expresión se emplean con dos finalidades: generar el ARN producto de la transcripción o bien producir la proteína codificada en la secuencia génica que portan (*proteína recombinante*). Los vectores de expresión son plásmidos o bien bacteriófagos**.**

Componentes de los vectores de expresión

En su estructura los vectores de expresión poseen los elementos básicos presentes en los vectores de clonación (origen de replicación, marcador de selección y sitio de clonación múltiple), además de contar en su secuencia con por lo menos un *promotor fuerte.* Se caracterizan por constituir un sistema de inducción simple y efectivo, tener una baja expresión basal y ser fácilmente transferible a otras cepas. También debe incluir secuencias de terminación de la transcripción y de adición de cola de poliadelinación, pues con ello el tránscrito estará protegido de la degradación de nucleasas, con lo que su vida media se extenderá. Otro factor importante presente en un vector de expresión es el sitio de unión al ribosoma (*internal robosome entry site*, IRES), que es la secuencia Shine-Dalgarno que precede el codón de inicio AUG de la traducción en los ARNm procariotes. Dicha secuencia es complementaria con el extremo 3' del ARNr 16S, cuya hibridación permite el ensamblaje de la maquinaria de inicio de la traducción. Además, debe considerarse la expresión basal del plásmido, lo que se conoce como *número de copias del plásmido*, característica determinada por la *fuerza* del sitio de origen de replicación, que origina plásmidos con un elevado número de copias *per se*. También debe considerarse que la presencia de promotores fuertes en plásmidos con un alto número de copias origina interferencias en la viabilidad celular. Algunos ejemplos de vectores de expresión son los de la serie pcADN3.1, pET161 y pDEST10, entre otros.

Clonación molecular

Usualmente, la célula hospedera del vector es una bacteria (*E. coli)*, pero también puede ser una célula eucariota. A la introducción de un vector a una célula eucariota se le denomina ***transfección*** y si el vector es un virus, ***transducción***.

La introducción del ADN recombinante tiene como propósito la *transformación* celular, es decir, que el material genético se incorpore de manera extracromosómica y se replique, transcriba y traduzca empleando la maquinaria enzimática de la célula huésped.

La clonación de cualquier fragmento de ADN involucra los siguientes pasos, los cuales se esquematizan en la figura 14-4**.**

1. Preparación del inserto de ADN que se va a clonar.
2. Preparación del vector para la clonación.
3. Ligación del inserto y el vector.
4. Preparación de células competentes.
5. Transformación celular.
6. Identificación de las colonias celulares que contienen el vector recombinante.

1. *Preparación del inserto de ADN que se va a clonar*. Involucra la digestión con enzimas de restricción para liberar el fragmento de interés de la molécula de ADN completa. La selección de la(s) enzima(s) que corten el ADN es un punto crítico que determina la facilidad y la eficiencia de la metodología. Para facilitar la clonación se prefiere el uso de enzimas de restricción cuyos sitios de corte estén presentes en el sitio de clonación múltiple del vector, con lo que se evita la necesidad de una posible modificación posrestricción del inserto. Asimismo, el inserto deberá cortarse con la(s) misma(s) enzima(s) o con unas que dejen los mismos extremos, de manera tal que la complementariedad de los extremos generados en el inserto coincida con los extremos del vector (figura 14-5). Debe tomarse en cuenta que la incorporación de un inserto con extremos romos (véase capítulo de enzimas de restricción) implica una eficiencia de 50% en la clonación, ya que en la mitad de las ocasiones el inserto va en el sentido apropiado (5'-3'), pero en el otro 50% de las ocasiones la inserción será en el sentido opuesto (3'-5'). El inserto, producto de la digestión enzimática, se purifica y separa de la molécula de ADN de donde proviene, mediante una electroforesis en gel de agarosa (véase capítulo de electroforesis). La banda correspondiente al inserto (que se verifica por el tamaño que presenta) se escinde del gel y se extrae y purifica mediante técnicas convencionales (figura 14-6).
2. *Preparación del vector para clonación*. Consiste en:
   a) Corte con la(s) misma(s) enzima(s) de restricción con que se digirió el inserto y obtener un ADN lineal. La estrategia de clonación debe diseñarse para que el corte genere extremos con secuencias complementarias a los extremos del inserto a clonar.
   b) Desfosforilación del vector con la finalidad de impedir la autoligación del vector. Se realiza usando la fosfatasa alcalina bovina de origen intestinal (CIP) o la

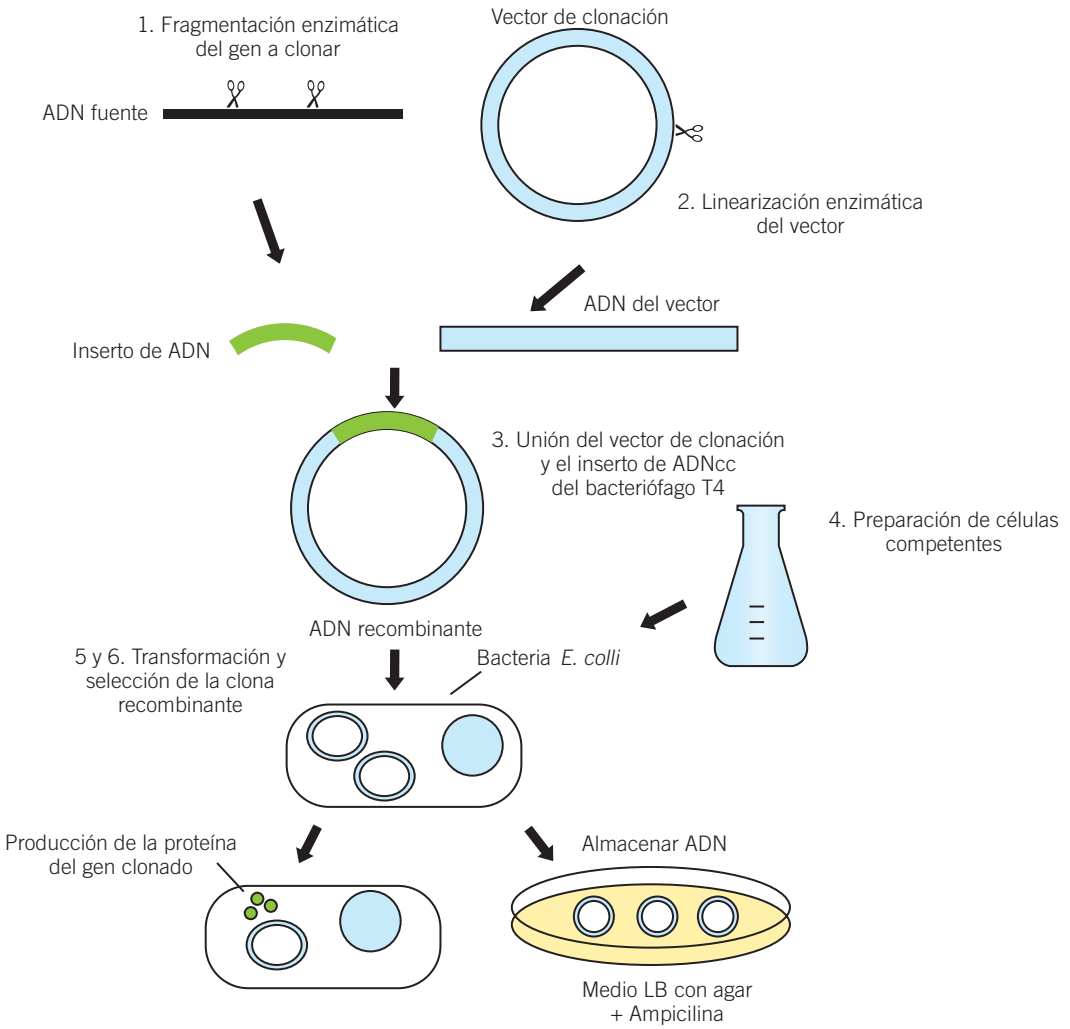


Figura 14-4. Estrategia general de clonación. El procedimiento esquematizado consta de los siguientes pasos: preparación del vector para clonación, preparación del inserto de ADN a clonar, ligación del inserto de ADN con el vector, la transformación de bacterias y la identificación de las colonias que contienen el vector recombinante. Una vez que se obtiene el vector recombinante, puede utilizarse para producir proteínas recombinantes o para almacenar el ADN.

fosfatasa bacteriana (BAP) que elimina los grupos fosfato 5' de una cadena de ADN.

c) Purificación del vector. Consiste en eliminar las partículas de agarosa, los restos de enzimas inactivadas y las sales provenientes de la reacción de digestión. En general, se realiza empleando columnas de resinas con alta afinidad al ADN en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas. Esto permite una elución de la muestra en volúmenes pequeños de agua o *buffer* con baja concentración de sales. También existe la posibilidad de purificar por la técnica fenol:cloroformo modificada, para obtener ADN plasmídico (evitando la extracción del ADN genómico); sin embargo, presenta el inconveniente de que para su realización consume mucho tiempo y que en general se obtiene un ADN plasmídico de menor calidad (véase el capítulo de métodos de extracción de ácidos nucleicos).

Otra estrategia de ligación consiste en el uso del fragmento largo de la polimerasa (fragmento Klenow), que "*rellena*" los extremos cohesivos generados por cualquier enzima y los convierte en romos. Sin embargo, los extremos romos en el vector no dirigen la inserción, por lo que la eficiencia de clonación disminuye, como se mencionó previamente (ver la figura 14-5).

3. *Ligación del inserto con el vector*. La ligación de un segmento de ADN exógeno a un vector involucra la formación de enlaces fosfodiéster entre los residuos fosfato que se localizan en los extremos 5' de la cadena de ADN y los residuos hidroxilo 3'. Esta unión la cataliza *in vitro* una enzima denominada *ligasa*. Las más utilizadas son la ligasa de *E. coli* y la T4 ligasa de bacteriófagos. Para la

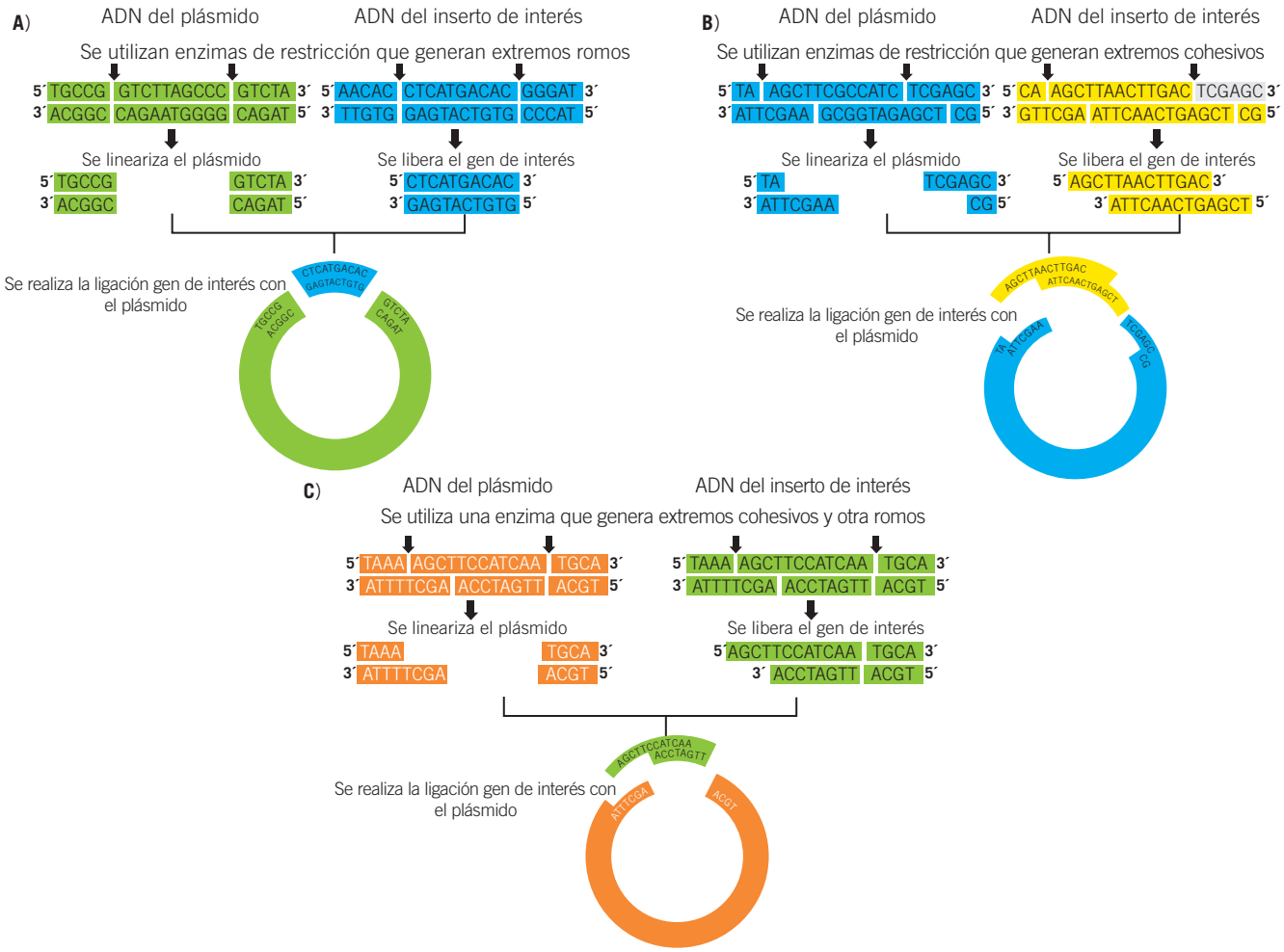


Figura 14-5. Estrategias de clonación. Según el tipo de extremos que se generan con el corte por las enzimas de restricción del vector e inserto que se va a clonar, se pueden tener las siguientes opciones: clonación de extremos romos con romos **A)**, cohesivos con cohesivos **B)**, o cohesivos con romos **C)**.

reacción de ligación existen diferentes protocolos, que dependen del tipo de extremos generados por las enzimas de restricción. Los requerimientos generales que deben considerarse para las ligaciones se describen en el cuadro 14-2.

4. *Preparación de células competentes*. Para su replicación, los vectores requieren encontrarse dentro de una célula, que debe prepararse para hacerla permeable a la entrada del vector recombinante, proceso denominado *generación de células competentes*. Las células competentes generalmente son células procariotas. La bacteria más utilizada para este procedimiento es *E. coli*, que carece de un mecanismo natural para la incorporación de ADN exógeno. El *estado de competencia* puede inducirse por diferentes métodos de laboratorio, y la elección del método dependerá del procedimiento de transformación seleccionado.

Uno de los métodos de competencia más utilizados consiste en tratar las bacterias con una solución de $CaCl_2$. Se desconoce el mecanismo exacto por el cual este compuesto induce la competencia. Sin embargo, una explicación sostiene que la membrana bacteriana es permeable a los iones cloro, mas no a los iones calcio, de manera que los iones Ca^{++} se rodean de moléculas de agua para entrar a la célula, lo que provoca que la célula se abulte, lo que facilita la formación de poros y la entrada del ADN. Este procedimiento se prefiere para células que se van a transformar usando precipitados de $ClCa_2$. Para lograr el estado de competencia por cualquiera de las técnicas se requiere que las células se encuentren en la fase logarítmica de crecimiento (OD entre 0.5 y 0.7), que corresponde a una densidad celular de 5×10^7 cel/ml). Otro método para conferir competencia a las bacterias es someterlas a lavados consecutivos por 4-5 veces con una solución de glicerol a 10%, para obtener células libres de iones y proteger a la membrana celular del daño que ocasionará la electroporación por la cual se transformarán.

Con independencia del procedimiento empleado para inducir el estado de competencia, las células pue-

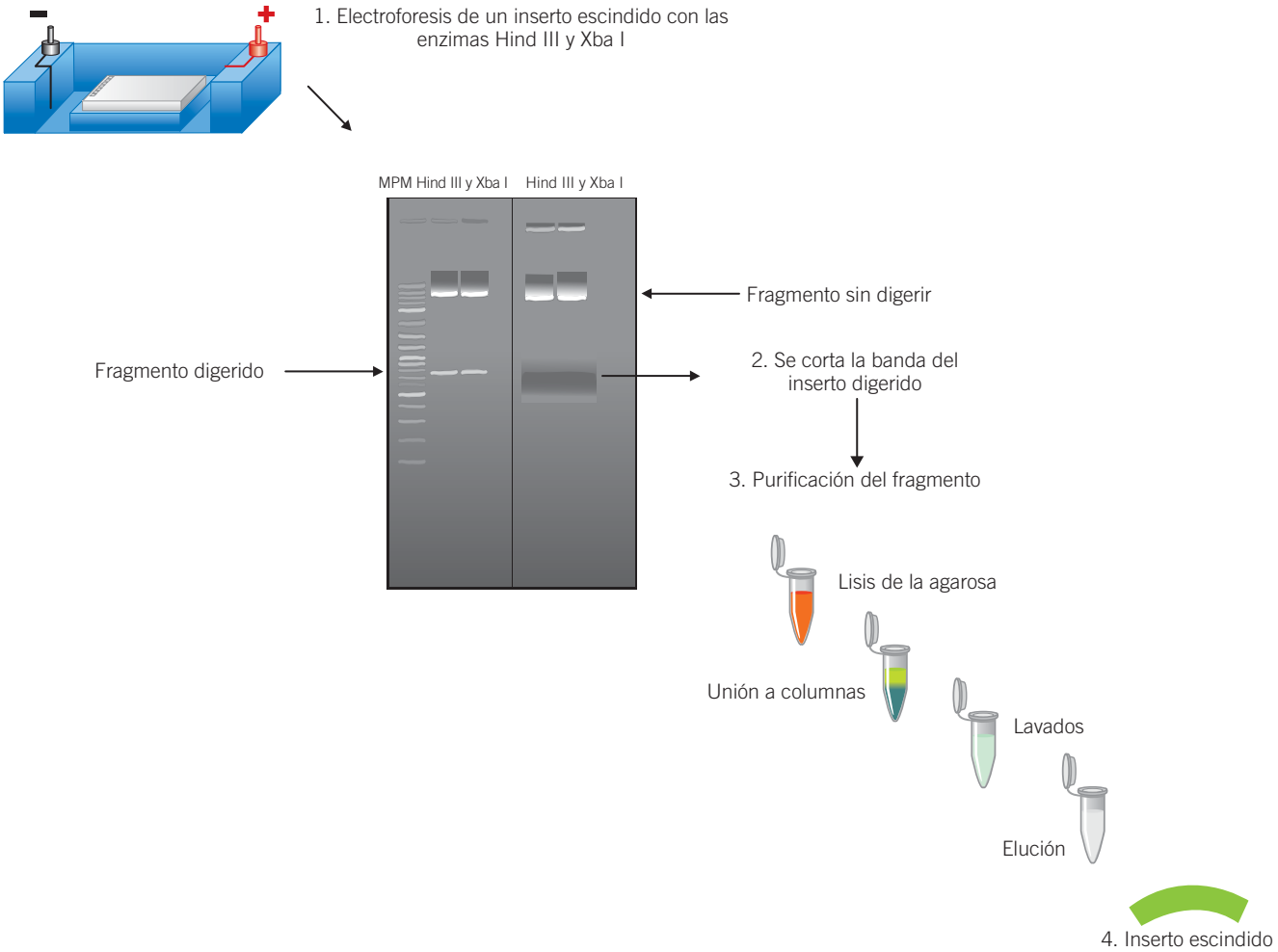


Figura 14-6. Purificación del inserto a clonar. Después de la digestión enzimática con que es escindido el inserto del ADN de origen, el inserto se purifica del resto de la molécula de ADN de donde proviene, mediante una electroforesis en gel. En la imagen, un inserto es liberado empleando las enzimas Hind III y Xho I, y en la electroforesis se visualiza el fragmento digerido. Un corte de la agarosa a la altura de la banda del inserto digerido lo aísla del resto de la molécula de origen que no haya liberado el inserto. Para extraer el inserto de la agarosa, se purifica el ácido nucleico empleando técnicas comerciales de extracción y purificación de ADN por columnas iónicas.

Cuadro 14-2. Requerimientos para la clonación de insertos de ADN.

Extremos acarreados por el inserto de ADN	Requerimientos para la clonación	Comentarios
Extremos romos	Alta concentración de ADN.	Los plásmidos recombinantes pueden acarrear copias en tándem del inserto de ADN.
Extremos cohesivos diferentes	Para una máxima eficiencia se requiere la purificación del vector después de la digestión con las dos enzimas de restricción.	Los sitios de restricción de las uniones entre el vector y el inserto de ADN son usualmente conservados. El número de clonas no recombinantes es bajo. El fragmento de ADN es insertado en una sola orientación en el vector recombinante.
Extremos iguales	Tratamiento con fosfatasa del vector linearizado.	Los sitios de restricción de las uniones entre el vector y el inserto de ADN son usualmente conservados. El fragmento de ADN es insertado en cualquier orientación en el vector recombinante. Los plásmidos recombinantes pueden acarrear copias en tándem del inserto de ADN.

Los requerimientos para la ligación del inserto de ADN con el vector de clonación serán particulares, según los tipos de extremos generados por las enzimas de restricción que se emplean para el corte del inserto y vector.

den almacenarse de forma indefinida sin perder su competencia en una solución acuosa con glicerol a 10%, para impedir que al descongelarse se lisen.

5. *Transformación en bacterias*. La transformación bacteriana consiste en la adquisición de ADN exógeno, que le confiere un nuevo fenotipo a la célula huésped. Entre los métodos más comunes se encuentran la transformación química y la transformación por electroporación.

   Cabe resaltar que el termino *transformación* se refiere a la introducción de material genético a través de vectores a las bacterias; el término *transducción* describe la introducción del ácido nucleico exógeno en una célula por medio de un vector viral, y el término *transfección* implica la introducción del material genético en las células empleando agentes químicos o físicos.

   a) *Transformación química:* esta técnica está basada en estudios realizados por Mandel e Higa en 1970, en los que observaron que la incorporación de ADN del fago λ por células bacterianas se incrementaba sustancialmente en presencia de cloruro de calcio. Posteriormente, este método se aplicó para la introducción de ADN plasmídico a células bacterianas. En este procedimiento las células y el ADN plasmídico se incuban en una solución hipotónica de $CaCl_2$, que forma un complejo con el ADN que facilita su entrada por endocitosis a una célula competente; además, se aplica un breve choque térmico a 42°C por 90 segundos que incrementa la permeabilidad de la membrana celular. La eficiencia de este método es de 1×10^4 a 1×10^6 células transformadas/µg de plásmido, misma que varía dependiendo de la longitud del plásmido y la cepa de bacterias utilizadas. Es un método sencillo y proporciona una buena eficiencia de transformación para muchos de los procedimientos de rutina, aunque puede incrementarse utilizando otros cationes divalentes, como el rubidio y el manganeso.

   b) *Transformación por electroporación:* consiste en la aplicación de breves pulsos eléctricos de alto voltaje (> 1 500 V/5 ms) a las células receptoras, para formar poros en la membrana plasmática en células eucariotas y/o la pared celular en bacterias. Los componentes de la membrana se desestabilizan, lo que permite la entrada del vector al citoplasma de la célula. Esta es la técnica de transformación bacteriana más eficiente, ya que se obtienen alrededor de 1×10^8 células transformadas/µg de plásmido. Por otro lado, este método es la mejor opción para plásmidos *grandes* de hasta 50 kb. La electroporación no es exclusiva de las bacterias, ya que puede utilizarse en células eucariotas. Además, es el método de elección cuando las células son resistentes a los métodos tradicionales de transfección y transformación. Ambos procesos se esquematizan en la figura 14-7.

   Debe considerarse que factores como la longitud del vector influyen de forma significativa en la eficiencia de transformación, con independencia del método empleado para la misma.

6. *Identificación de las colonias que contienen el vector recombinante*. Para identificar las bacterias transformadas se utilizan marcadores de selección proporcionados por los vectores. Los más utilizados son los genes de resistencia a antibióticos, como la ampicilina, la tetraciclina, el cloramfenicol y la kanamicina. Después de la transformación, las bacterias se siembran en cajas petri con agar suplementado con el antibiótico, para el cual el plásmido es resistente. Si la transformación ha sido exitosa las bacterias serán capaces de metabolizar el antibiótico y vivirán, lo que indicará que incorporaron el vector (ver la figura 14-2); cada colonia representa un solo evento de transformación. Otros marcadores de selección se basan en la producción de moléculas fluorescentes o bien en la producción de enzimas que, al reaccionar con un sustrato, producen coloración en la colonia de células transformadas.

Aplicaciones de la clonación molecular

La clonación génica tiene múltiples aplicaciones y ha sido el principal impulsor de la biotecnología y la metodología del ADN recombinante. Este proceso puede emplearse para la producción de proteínas eucariotas en bacterias (proteínas recombinantes), como hormonas, antibióticos, vacunas, generación de cultivos transgénicos resistentes a plagas o sequías, producción de animales transgénicos capaces de producir en su leche proteínas recombinantes (véase capítulo de organismos transgénicos), así como para el establecimiento de librerías genómicas o genotecas, que han permitido secuenciar por completo el genoma humano y el de otros organismos.

Genotecas

Una biblioteca genómica o genoteca es una colección de fragmentos de ADN, provenientes del genoma de un organismo, clonados en vectores para facilitar su estudio. Se pueden construir genotecas de ADN o de ADN.

Genotecas de ADNc

Los bancos de ADNc se construyen a partir de secuencias de ARNm mediante una reacción *in vitro* que sintetiza una primera cadena de ADNc utilizando una ADN polimerasa con actividad de transcriptasa inversa. El ARNm que no se copia a ADNc se elimina con la adición de la enzima ARNasa H. La segunda cadena de **ADNc,** complementaria a la obtenida de la retrotranscripción, se sintetiza en una reacción de PCR (véase capítulo de reacción en cadena de la polimerasa) o empleando una DNAc polimerasa que utilice la cadena sencilla del ADNc como templado. Posteriormente, este ADNc de doble cadena se clona en un vector. La producción de una biblioteca de ADNc se esquematiza en la figura 14-8.

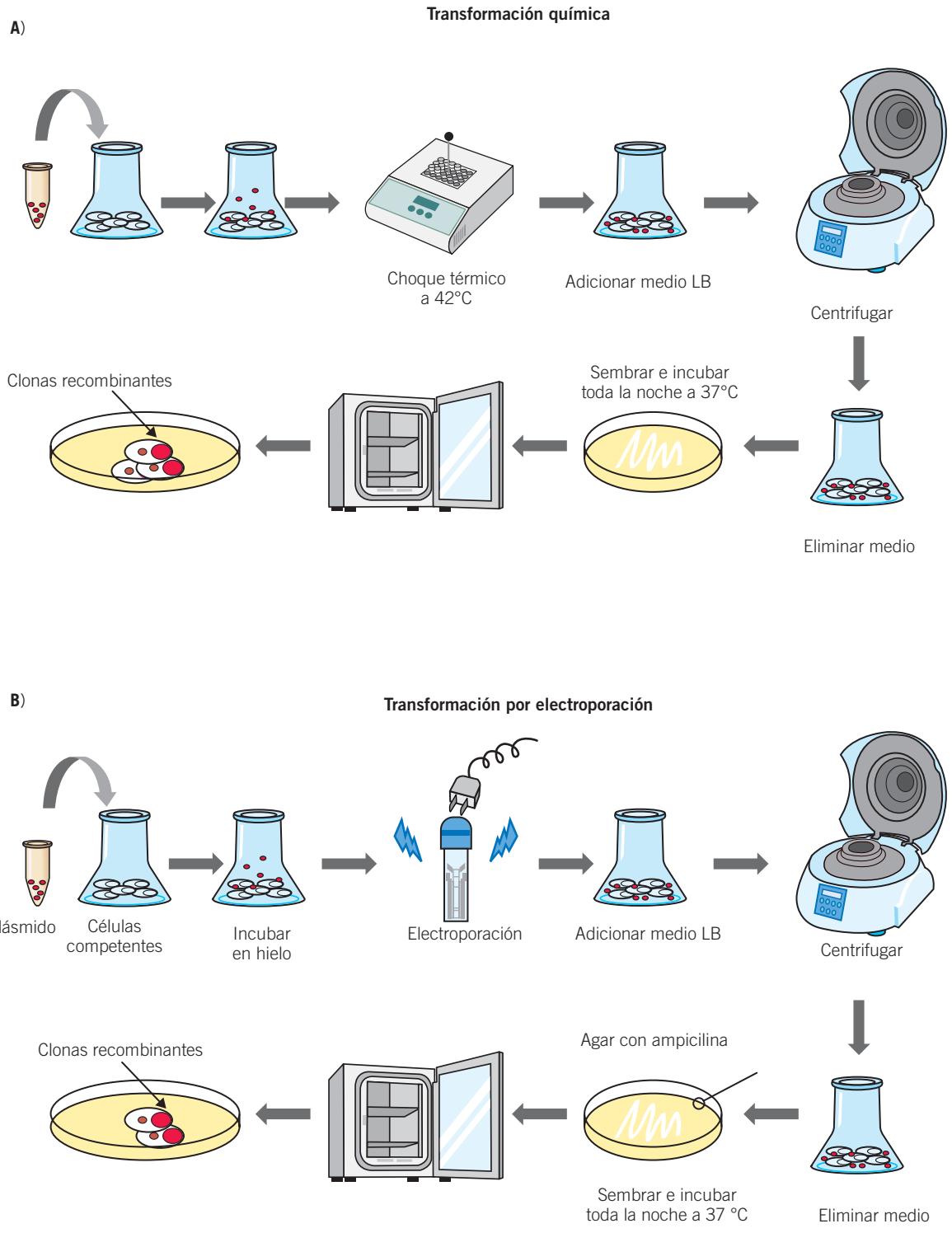


Figura 14-7. Transformación de bacterias. A) Transformación química. Para la transformación química se añade el plásmido deseado a las células químicamente competentes que se encuentran en una solución con $CaCl_2$, que junto con el vector forma un complejo insoluble. Un choque térmico a 42 °C facilita la entrada del complejo ADN-$CaCl_2$ a la célula. Se añade medio LB para que las células crezcan y se reproduzcan con el plásmido insertado. Posteriormente, se siembran en agar con antibiótico del gen de resistencia que contiene el plásmido y se seleccionan las colonias resistentes que contienen el vector recombinante. **B) Transformación por electroporación.** En la transformación por electroporación la diferencia estriba en que en lugar de un choque térmico se aplican pulsos eléctricos que desestabilizan la membrana celular y permiten la entrada del vector.

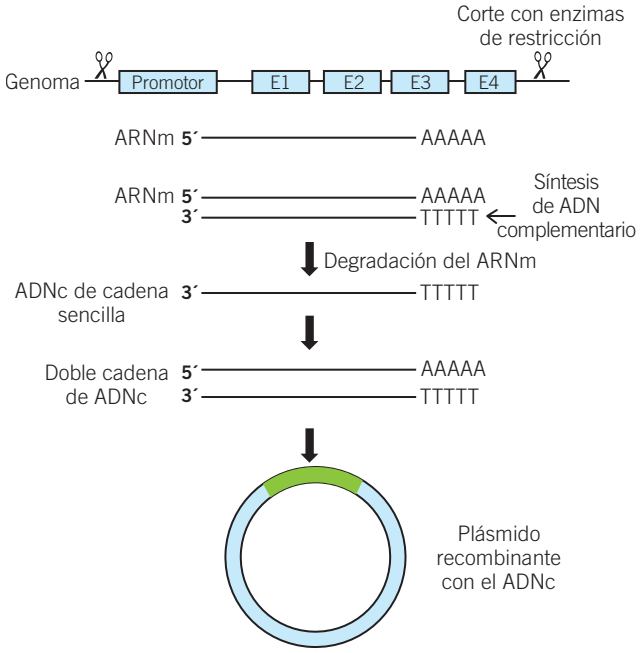


Figura 14-8. Producción de una genoteca de ADN complementario. Las genotecas de ADNc se construyen a partir de la secuencia de ARNm, de los cuales se sintetiza el ADNc por retrotranscripción. El ARNm remanente es degradado, y la cadena complementaria del ADN de cadena sencilla para formar un ADN de doble cadena se sintetiza con ayuda de una ADN polimerasa. Los fragmentos de ADNc de doble cadena se clonan en el vector de elección.

Genotecas de ADNg

Para construir bancos de ADN es necesario aislar el ADNg del organismo de interés. Este ADNg se corta con enzimas de restricción para generar fragmentos con extremos complementarios a los del vector de clonación. Una vez que se ha construido la genoteca, se rastrea el clon o clones que portan el ADN con el gen de interés. Los métodos más frecuentes de identificación de clones recombinantes en una genoteca son la hibridación usando alguna sonda marcada (véase capítulo de técnicas de hibridación), el uso de anticuerpos frente a la proteína de interés o la selección de clonas por la actividad biológica de la proteína. En la actualidad, gracias a los adelantos de la metodología del ADN recombinante, es posible separar regiones determinadas de ADN, secuenciarlas, alterar la secuencia e introducir ese ADN exógeno a las células de un organismo, y aun a células germinales, para la producción de organismos transgénicos (véanse detalles en el capítulo de organismos transgénicos).

Producción de proteínas recombinantes

La clonación molecular ha permitido determinar la función de múltiples proteínas y generar proteínas recombinantes, que han reducido los costos de producción de hormonas o proteínas requeridas en la terapéutica, de las cuales previamente sólo se disponía de pequeñas cantidades por la escasez de fuentes, y la dificultad en su aislamiento o purificación. La facilidad en la producción de las proteínas recombinantes ha revolucionado el área biotecnológica, que ahora es un mercado dominante en el mundo de la biología molecular y cubre más de 10% de toda la industria farmacéutica. Las proteínas recombinantes se producen en bacterias (*E. coli*, *B. subtilis*), levaduras (*Saccharomyces cereviceae*, *Pichia pastoris*), células de insecto (*Spodoptera frugiperda*-9) y células de mamífero (células de ovario de hámster chino –CHO–, línea celular de riñon de hámster bebé –BHK– y HEK293 de riñón de embrión humano). Para maximizar la expresión de las proteínas se emplean promotores fuertes que aseguren la expresión por arriba de 10% del total de las proteínas celulares, aunque esto impone una carga metabólica a las células bajando la velocidad de su crecimiento, por lo que ciertas proteínas recombinantes pueden resultar tóxicas para las células que las producen. También puede alterarse la secuencia del gen de interés sustituyendo codones para los que hay ARNt poco frecuentes y reemplazarlos por aquellos que codifican para el mismo aminoácido, pero que se usan más en el organismo huésped. Asimismo, la producción de proteínas recombinantes en plantas presenta la ventaja de que su disponibilidad es prácticamente ilimitada de biomasa, y los costos de producción son bajos, pues una vez establecido el cultivo no se requiere personal especializado, no presenta riesgos de contaminación con patógenos animales, endotoxinas bacterianas o secuencias de ADN oncogénicas. Una ventaja adicional es que las plantas permiten el almacenamiento estable de la proteína recombinante en semillas y tubérculos, lo que facilita su conservación, transporte y distribución. Esto permite el abaratamiento de costos respecto a otros sistemas de producción. Así, existen ya biorreactores vegetales que producen vacunas comestibles, en tubérculos u hojas de lechuga, como por ejemplo para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humana.

La clonación molecular ha incrementado las perspectivas iniciales de la metodología del ADN recombinante y, de cierta manera, sentó las bases para la clonación de organismos e impulsó el desarrollo de la biotecnología, que ha tomado un papel protagónico en las ciencias de la salud.

Ejercicios de integración

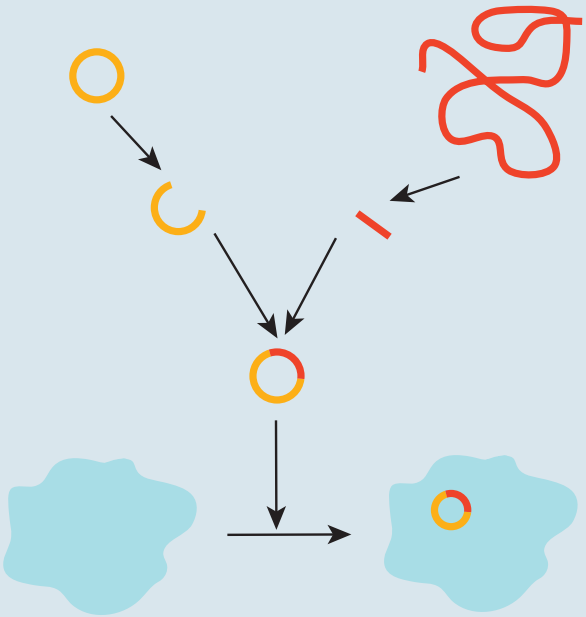
1. Correlacione las columnas eligiendo el vector más indicado para cada uno de los siguientes insertos.

Inserto	Vector
Genoma de *M. tuberculosis*	pcADN 3.1
ADNc de insulina	pGLO
Gen de colágena	Fago
Genoma de *M. musculus*	YAC
ADNc de miostatina	BAC

2. Ordene cada paso necesario para la producción de una proteína recombinante, colocando el número del 1 al 10 que corresponda.
   - Corte del inserto con enzima(s) de restricción
   - Purificación del vector
   - Transformación celular
   - Ligación inserto/vector
   - Selección del ARNm
   - Selección de la clona celular transformada
   - Purificación de la proteína recombinante
   - Expresión de la proteína recombinante
   - Conversión del ARNm a ADNc
   - Corte del vector con enzima(s) de restricción
   - Purificación del inserto
3.
   a) Dibuje la estructura de un extremo de un fragmento de ADN lineal producido por una digestión con *Xho*I.
   b) Dibuje la estructura resultante si la estructura derivada de la pregunta anterior se trata con una nucleasa que sólo degrada ADN monohebra.
   c) Dibuje la estructura de un extremo de un fragmento de ADN lineal producido por una digestión con *Pvu*II.
   d) Dibuje la estructura producida al ligar el extremo de la parte (b) con el de la (c).

   Pregunta. ¿Cuántos sitios de reconocimiento para la enzima EcoRI existen en el plásmido pX si al analizar mediante electroforesis en geles de agarosa el producto de la digestión produce 4 fragmentos de ADN de diferentes tamaños?

   Pregunta. ¿Es aconsejable preparar el inserto que se va a clonar en dos enzimas de restricción diferentes, las cuales también se emplean para cortar el vector al cual se unirá el inserto? ¿Es la única forma posible? Comentar.
4. En la imagen que se presenta inserte los siguientes términos donde crea conveniente: ADN recombinante, inserto, ADN genómico, vector, corte con enzima de restricción, ligación, transformación celular, *E. coli*, linearización del vector.



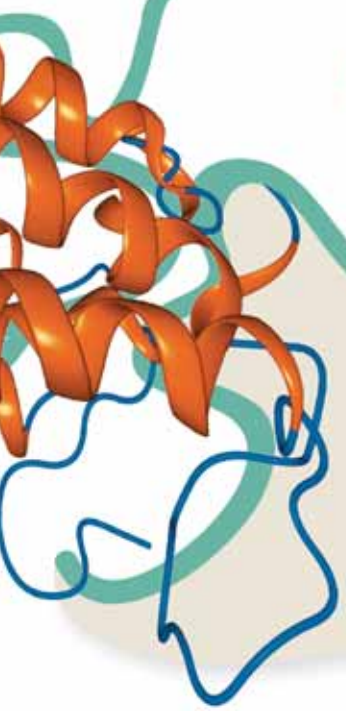
Bibliografía

Berger S.L., Kimmel A.R. *Guide to molecular cloning techniques. methods in enzymology,* Vol. 152. Londres: Academic Press, 1987:161-522.

Orozco G. *Genética y biomedicina molecular.* Noriega Limusa, Colección de Textos Politécnicos, Serie Biotecnologías.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual,* 3ª ed. Vol 1. Nueva York: CSHL Press, 2001.

Surzycki S. *Basic techniques in molecular biology. DNA Cloning general considerations,* Capítulo 13; DNA cloning experimental procedures, Capítulo 14. Berlín, Heidelberg: Springer-Verlag, 2000:298-319, 339-347, 352-373.



Capítulo 15

Técnicas de hibridación

Miriam Ruth Bueno Topete / Jaime González Cuevas

Introducción

Al revelar los numerosos métodos mediante los cuales las células procesan, añaden, eliminan y transfieren información genética, los biólogos moleculares abrieron el camino para el desarrollo de sus propias manipulaciones genéticas. En los últimos años, se han desarrollado técnicas que han permitido abordar el análisis y la manipulación del ADN de una forma antes inimaginada. La tecnología del ADN recombinante ha hecho posible investigar más a fondo la estructura y la función de los genes, en especial de los genes eucarióticos, inaccesibles por otros métodos. Cuando los investigadores se enfrentaron por primera vez con el gran tamaño y la complejidad del ADN, incluso el del virus más simple, la posibilidad de descifrar la información genética codificada parecía estar más allá de toda esperanza. Se hizo evidente que para estudiar un gen individual, se lo debía aislar del resto del genoma ya que, cada gen representa una pequeña sección dentro de un cromosoma y, en ese contexto, no puede individualizarse. Para el aislamiento de un gen o de fragmentos más pequeños, el ADN debe fragmentarse. Si bien la rotura del ADN puede realizarse mecánicamente, por este medio la fragmentación se produce al azar. La obtención de fragmentos específicos de ADN fue posible mediante un método desarrollado a partir de herramientas propias de ciertos organismos. Para avanzar hacia un estudio más detallado del ADN fue necesaria una metodología que permitiera obtener grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN. Estos fragmentos podían ser ADN genómico, ADN complementario (ADNc) o ADN obtenidos a partir de oligonucleótidos sintéticos. A menudo, antes de que un determinado fragmento de ADN o de ARN mensajero (ARNm) pueda manipularse de cualquier modo, primero debe localizarse. Los cromosomas, incluso los de las células eucarióticas más simples, contienen una enorme cantidad de ADN, por lo que localizar un segmento específico es como tratar de encontrar la proverbial aguja en el pajar. Para localizar fragmentos específicos se utiliza la técnica de hibridación de ácidos nucleicos. Entre las técnicas de hibridación más comunes se encuentran Southern blot, Northern blot, Slot blot, Dot blot e hibridación *in situ*. Antes de abordar cada metodología es importante mencionar algunos aspectos básicos que facilitarán el entendimiento técnico de estas herramientas de la biología molecular, como son la electroforesis de ácidos nucleicos y la definición de sondas.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando se someten a la influencia de un campo eléctrico como consecuencia de su relación carga/masa. Los ácidos nucleicos son moléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. La naturaleza del enlace fosfodiéster de las cadenas polinucleotídicas condiciona la carga de un ácido nucleico, que es aproximadamente igual al número de grupos fosfato. La electroforesis en geles de agarosa se lleva a cabo en aparatos apropiados, cámaras generalmente horizontales, y requiere de dos elementos indispensables: la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es el medio amortiguado que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico. La fase estacionaria, o soporte, es un polímero de naturaleza gelatinosa conocida como *agarosa* (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición más homogénea). Dependiendo de su concentración genera poros de cierto tamaño a través de los cuales migran los fragmentos de ADN o ARN. Normalmente la concentración es de 0.5 a 2%. La agarosa posee la propiedad de permanecer líquida a más de

50 °C y de formar un gel al enfriarse. Los fragmentos de ácidos nucleicos separados por electroforesis se visualizan mediante su tinción con bromuro de etidio, un colorante que se intercala entre las bases del ADN y que emite fluorescencia cuando se irradia con luz ultravioleta.

Sondas

Las sondas son segmentos de ADN o ARN de cadena sencilla marcados con moléculas reporteras, como enzimas o radioisótopos, que permiten su fácil detección. El diseño de la sonda, es decir, su secuencia nucleotídica, es lo que le permitirá, entre miles de fragmentos que forman parte del genoma de un ser humano, identificar "un solo gen" o "el fragmento de un gen". Gran parte del éxito de este tipo de estrategias moleculares depende de la especificidad de la sonda. La longitud de las sondas puede ir de 15 a 30 bases, conocidas también como *oligonucleótidos*, hasta miles de bases de nucleótidos. Pueden sintetizarse y purificarse con relativa facilidad por instrumentos comerciales disponibles en la actualidad. En términos generales las sondas se obtienen a partir de síntesis química o de plásmidos, que se clonan con la sonda de interés. La especificidad de la síntesis de la sonda dependerá del objetivo de estudio (por ejemplo, el diagnóstico de mutaciones en enfermedades genéticas o la identificación de un polimorfismo).

Southern blot

Fundamento

La técnica de Southern blot la desarrolló, en 1975, Edwin Southern y es una estrategia estándar para analizar ADN previamente digerido con enzimas de restricción.

Esta técnica se utiliza para determinar la presencia de un gen o fragmentos del ADN específicos en una mezcla de ácidos nucleicos previamente extraídos.

Se basa en la aplicación de dos procesos fundamentales: la desnaturalización o separación de las cadenas complementarias del ADN y la hibridación o unión de dos cadenas complementarias. Este fundamento es compartido por todas las técnicas de hibridación.

Procedimiento técnico

En este procedimiento, primero se aísla el ADN de cualquier célula del organismo excepto de glóbulos rojos, ya que carecen de núcleo. Para el análisis molecular de un pacien-

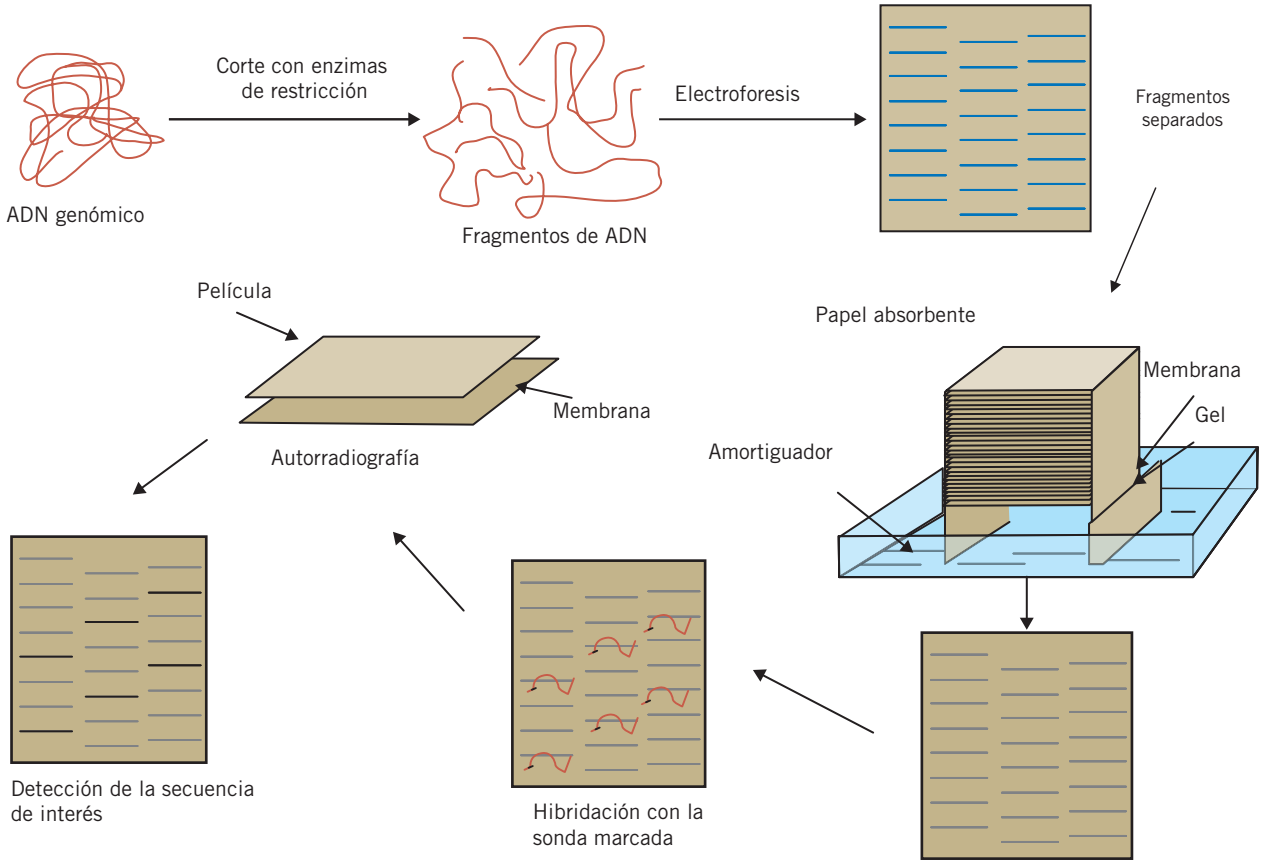


Figura 15-1. Esquema representativo de cada uno de los pasos involucrados en la técnica de Southern blot. Obtención del ADN genómico y digestión con enzimas de restricción, electroforesis, transferencia, hibridación específica con una sonda y detección de la secuencia de interés.

te, el ADN puede obtenerse de linfocitos. Sin embargo, la extracción puede hacerse también de otras fuentes: cultivos celulares, células de líquido amniótico, vellosidades coriónicas o cualquier órgano biopsiado. Una vez extraído el ADN, se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se separan por electroforesis en geles de agarosa, de acuerdo con su carga/masa. En algunas ocasiones se utilizan geles de acrilamida cuando los fragmentos que se van a separar son muy pequeños. En este procedimiento electroforético, como ya se mencionó, las muestras se someten a un campo eléctrico; como los fragmentos de ADN tienen carga negativa (por sus grupos fosfato) todos se mueven en la misma dirección hacia el electrodo positivo, y los fragmentos más pequeños migran más rápidamente.

Las moléculas de ADN separadas pueden visualizarse mediante su tinción con bromuro de etidio. En este momento el procedimiento no es informativo, debido a que el fragmento de interés se encuentra inmerso en millones de fragmentos creados por las enzimas de restricción. Posteriormente, el ADN se desnaturaliza para obtener cadenas sencillas, mediante un proceso químico, generalmente por tratamiento con álcalis. A continuación, los fragmentos se transfieren del gel a un soporte sólido, como membranas de nitrocelulosa o de nailon. Existen diferentes métodos para la transferencia, como la capilaridad, el vacío o la electrotransferencia. Es importante señalar que la finalidad de la transferencia es crear una réplica de lo que se tenía en el gel, ahora en un soporte mucho más sólido, como es una membrana. Por último, para identificar uno o más fragmentos entre millones de fragmentos, se utiliza una sonda específica marcada con alguna molécula reportera (por ejemplo, "radiactividad", ^{32}P-dCTP). La sonda se pone en contacto con la membrana de nitrocelulosa y en aquellos lugares en donde la sonda encuentre su secuencia complementaria se pegará, proceso conocido como *hibridación*. La sonda emitirá radiactividad, la cual se detectará mediante un proceso de revelado con placas de rayos X. La emisión de la sonda corresponderá únicamente al fragmento de interés. En la figura 15-1 se observa un esquema de cada uno de los pasos involucrados en la técnica de Southern blot.

Marcaje de las sondas

Las sondas pueden marcarse radiactivamente (en general con ^{32}P) o enzimáticamente (biotina, digoxigenina, etc.). Una ventaja de los sistemas enzimáticos es que, una vez marcada la sonda, su vida media es muy larga (meses), mientras que el marcaje radiactivo es más corto (para ^{32}P, de 15 días). Sin embargo, la sensibilidad varía: las radiactivas detectan hasta 0.1 pg de ácido nucleico y las enzimáticas, entre 1 y 10 pg. Las sondas pueden marcarse en un extremo o a lo largo de toda la cadena. Para marcar en un extremo puede utilizarse la enzima polinucleótido cinasa (que introduce un único nucleótido marcado en el extremo 5' de la sonda) o la enzima transferasa terminal (que introduce varios nucleótidos marcados en el extremo 3' de la sonda).

El marcaje en toda la sonda se realiza por el procedimiento de *nick traslation* (figura 15-2). En este método se combinan dos actividades enzimáticas:

1. Actividad ADNsa 1, que suprime un nucleótido al azar de una de las dos cadenas de la sonda.
2. Actividad de ADN polimerasa, que, a partir del hueco dejado en la cadena deADN por la ADNsa 1, va incorporando nuevos nucleótidos por complementariedad (entre los que están marcados), tomando como molde la otra cadena de ADN intacta.

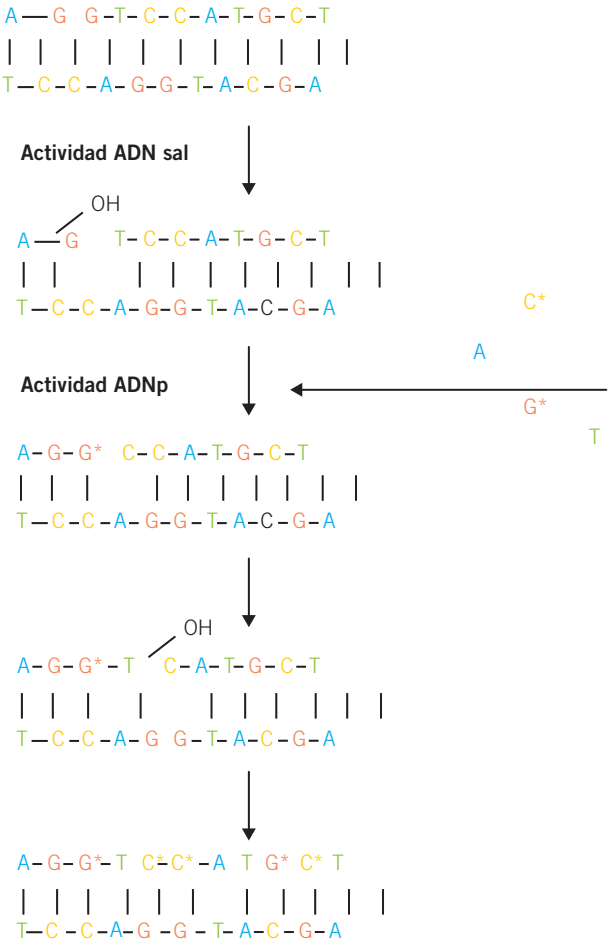


Figura 15-2. Marcaje de una sonda del ADN por *nick translation*. En el primer paso de la reacción la enzima ADNsa 1 produce una pequeña rotura (*nick*) en una de las cadenas del ADN. A partir de ésta, la ADN polimerasa 1 añade nucleótidos al extremo 3' OH generados. Dicha enzima tiene, además, actividad de exonucleasa 5'-3', que libera nucleótidos del 5' del *nick*. La eliminación de nucleótidos del extremo 5' y la adición de nuevos nucleótidos al extremo 3' provoca el movimiento del *nick* a lo largo del ADN (*nick translation*). La sustitución de uno o más de los nucleótidos que van a ser incorporados de nuevo por nucleótidos marcados radiactivamente origina la formación de moléculas marcadas (sondas).

Otro método para marcar sondas es el de *random primers* (secuencias cortas de oligonucleótidos, normalmente hexámeros, que por su pequeño tamaño hibridan al azar a lo largo de toda la cadena). Al añadir la enzima ADN polimerasa 1 desde el lugar donde se unen los *primers*, van incorporándose nucleótidos en donde algunos van marcados radiactivamente hasta que finalmente se completa la cadena.

Aplicaciones

La técnica de Southern blot ha sido de gran utilidad para identificar genes asociados con enfermedades de transmisión genética, e identificar mutaciones, como rearreglos, deleciones y dosis génica en caso de portadores (figura 15-3).

También se utiliza para detectar polimorfismos en los fragmentos de restricción de diversos genes.

Northern blot

Diferencias con Southern blot

Es la contraparte del Southern blot y como ácido nucleico se utiliza ARN en lugar de ADN. A diferencia del Southern blot, con esta técnica no se utilizan enzimas de restricción, ya que las moléculas de ARN son más pequeñas y para su análisis no requieren su fraccionamiento. Sin embargo, prácticamente comparten todos los demás pasos, como son la electroforesis, la desnaturalización (aunque el ARN es de cadena sencilla, puede formar estructuras secundarias), la transferencia y la hibridación con una sonda.

Aplicaciones

Es una herramienta muy útil para el estudio de los productos de la transcripción génica (ARNm) y de su regulación, ya que se pueden estudiar las potenciales variaciones en la abundancia de especies del ARN en diferentes condiciones experimentales o comparar condiciones clínicas normales o patológicas.

Dot/slot blot

Tras el aislamiento y separación de los ácidos nucleicos, éstos se aplican directamente a la membrana sin separarlos, según su peso molecular; es decir, no se realiza electroforesis. La fijación se hace generalmente con vacío y en un molde cuyo pocillo puede tener forma de punto (*dot blot*) o ser lineal (*slot blot*) (figura 15-4). Es posible realizar detecciones no sólo cualitativas (positivo o negativo) sino también cuantitativas, utilizando como patrón diluciones seriadas

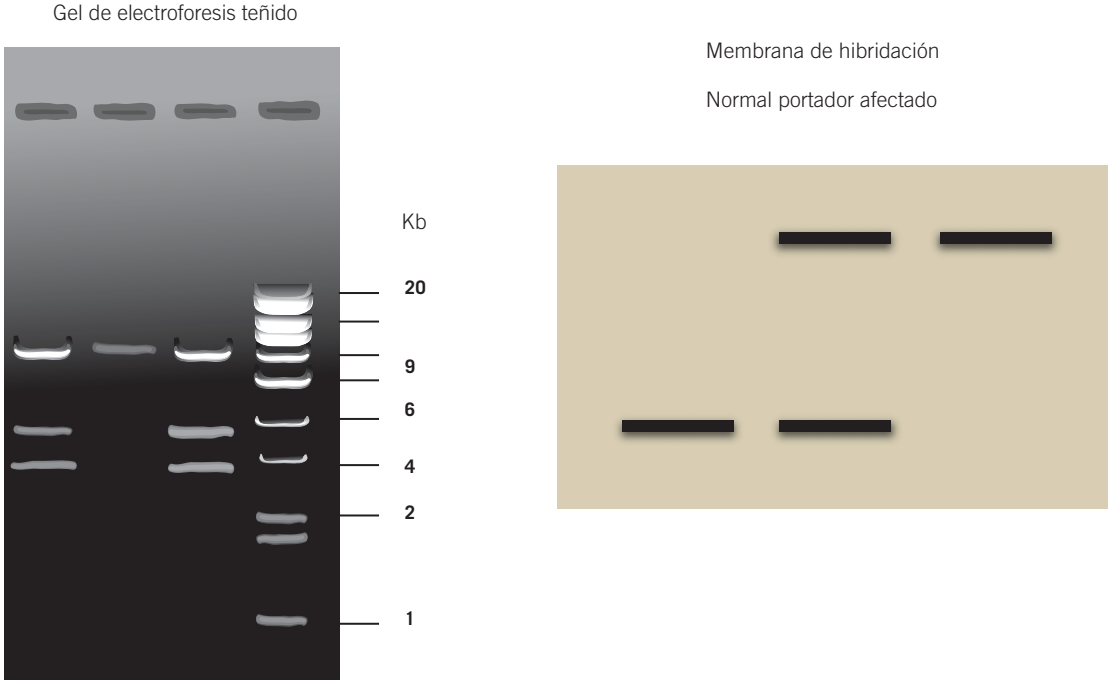


Figura 15-3. Southern blot para el diagnóstico de anemia falciforme. El esquema de la izquierda representa el ADN digerido con enzimas de restricción, separado por electroforesis y teñido con bromuro de etidio. Al extremo del gel, se observa un marcador de peso molecular como referencia, expresado en kilobases (Kb). El esquema de la derecha muestra el resultado de la hibridación, donde se observan las bandas que son reconocidas por la sonda. En este caso el diagnóstico fue dirigido hacia una hemoglobinopatía (anemia falciforme), una enfermedad autosómica recesiva. Por el método de Southern blot se observa claramente la dotación génica en caso de sujetos portadores y afectados por la enfermedad.

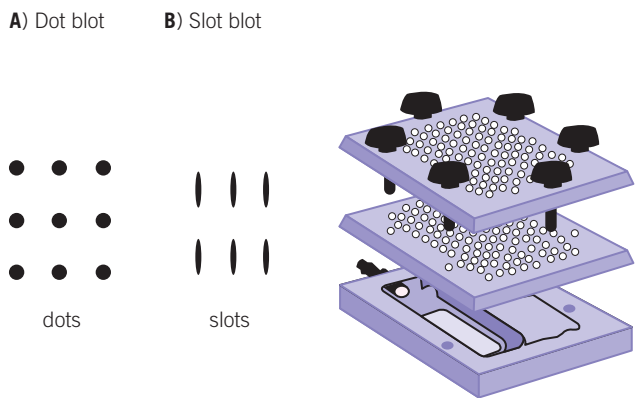


Figura 15-4. Esquema de la visualización del dot blot y slot blot. El tipo de soporte que se utiliza durante el proceso de fijación de los ácidos nucleicos en una membrana o filtro es lo que determina la forma en que se visualiza esta técnica molecular. **A)** Soporte que se utiliza para realizar un dot blot, donde los orificios están en forma de puntos. **B)** Soporte que se utiliza para realizar un slot blot, donde los orificios se encuentran en forma de líneas.

de concentraciones conocidas del genoma que se está determinando.

Hibridación *in situ*

Es un método histoquímico que emplea a la biología molecular de la misma manera que la inmunohistoquímica utiliza los métodos de la inmunología. Los principios de ambos métodos son semejantes y el resultado final es el mismo: la identificación de componentes tisulares que pueden observarse al microscopio. La especificidad de la inmunohistoquímica se basa en la unión antígeno/anticuerpo, mientras que la especificidad de la hibridación *in situ* se basa en la unión de una sonda con una secuencia complementaria de ADN o ARN dentro de un tejido. A diferencia de Southern blot y Northern blot, la hibridación *in situ* no requiere de la extracción de ácidos nucleicos, sino que en el mismo tejido se lleva a cabo el procedimiento de detección e hibridación; de ahí el nombre de *in situ* (en el mismo lugar). Las sondas que se utilizan para la hibridación *in situ* pueden ser radiactivas y no radiactivas. En la actualidad, las más relevantes son las marcadas con fluorescencia, modalidad conocida como hibridación *in situ* acoplada a un sistema de fluorocromos (FISH) (figura 15-5), o con biotina, ya que el detalle morfológico no se pierde, a diferencia de lo que ocurre con las modalidades radiactivas.

Aspectos técnicos

El primer paso para la hibridación es la preparación y fijación del tejido, en el cual deben conservarse los ácidos nucleicos lo más íntegramente posibles, mantener la morfología del tejido y permitir una accesibilidad suficiente para que la sonda penetre. La fijación con formalina, seguida de una inclusión con parafina es el procedimiento más usado. Después de la fijación las secciones de tejido deben adherirse al portaobjetos y no deben desprenderse durante el procedimiento de hibridación. Normalmente se utiliza gelatina crómica, polilisina o Vectabond® (producto comercial). Antes de la hibridación, los tejidos se pretratan con HCl (que extrae proteínas e hidroliza parcialmente las secuencias diana) y proteinasa K (que incrementa la penetración y la accesibilidad de la sonda) y se someten a una posfijación con paraformaldehído (incrementa la especificidad de la señal). El procedimiento es muy complejo, por lo que únicamente se han mencionado algunos de los aspectos más relevantes.

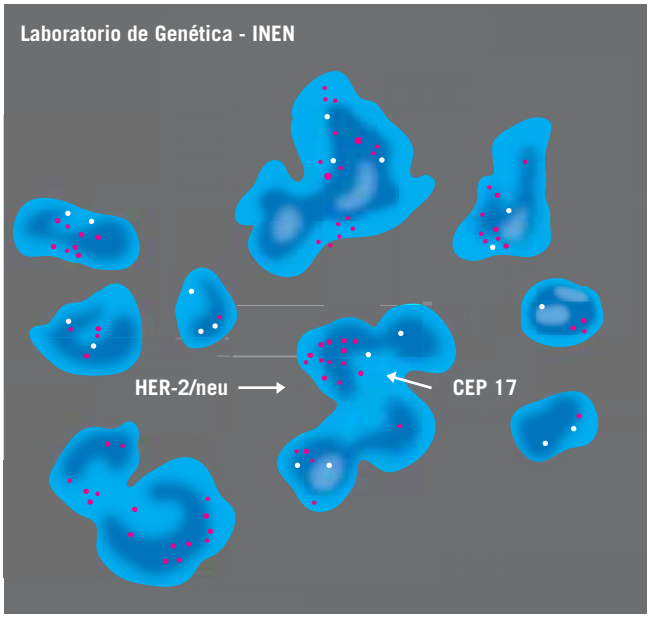


Figura 15-5. Técnica de FISH. Identificación del gen HER2/NEU en cáncer de mama por la técnica de FISH. El gen HER2/NEU se encuentra localizado en el cromosoma 17q, y su amplificación está presente en 25 a 30% de las neoplasias de mama; se relaciona estrechamente con los estadios avanzados, metastásicos, que implican mal pronóstico. En la actualidad existe un tratamiento con anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos específicamente contra el producto del gen HER2/NEU que mejora el pronóstico y la sobrevida del paciente.

Aplicaciones

La hibridación *in situ* tiene un alto grado de resolución, que permite la localización de secuencias génicas a nivel cromosómico, con lo que se pueden detectar translocaciones y otras alteraciones cromosómicas, así como el estudio de expresión de genes (ARNm) a nivel celular y subcelular. Las principales aplicaciones son la identificación de infecciones virales en tejidos, así como el mapeo cromosómico.

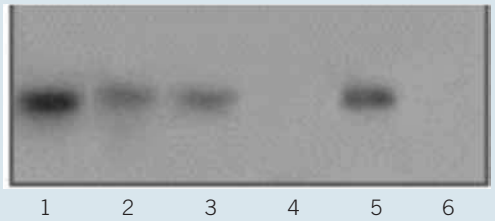
Ejercicios de integración

1. Consulte la secuencia número del ARNm de NFkB (NM_001077494.1) del banco de genes (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Según la información allí reportada, responda lo siguiente:
¿En qué posición del ARNm se unen las siguientes sondas?
a) 5'agctctgctggatcggcatggag3'
b) 5'acgcggacccgcgggcgtctaaaatt 3'

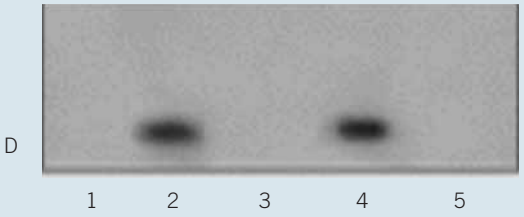
¿En qué exón se localizan estas secuencias?
¿Cuál es la secuencia complementaria de cada sonda?
Según lo mencionado en este capítulo, ¿cuál técnica de hibridación es la más adecuada para detectar el ARNm?

2. ¿Cuál de los siguientes enunciados es verdadero para la técnica Southern blot?
a) Se extrae ARN celular, separado por electroforesis y transferido a una membrana, se hibrida con una sonda marcada específica para un gen.
b) Se extrae ADN, se digiere con enzimas de restricción, los fragmentos generados son marcados con radiactividad, se separan por electroforesis y se transfieren a una membrana, donde hibridan con una sonda marcada específica para un gen.
c) Se utilizan fragmentos de ADN cortados con enzimas de restricción, que se separan por electroforesis y se transfieren a una membrana, donde se hibridan con una sonda marcada específica para un gen.

3. La siguiente fotografía muestra la hibridación de una sonda en el ADN digerido con enzimas de restricción de los miembros de una familia con alteraciones en el gen de distrofina. ¿Puede identificar cuáles individuos presentan el gen alterado?



4. La siguiente fotografía muestra la hibridación de una sonda en el ARNm del virus del papiloma humano en pacientes con sospecha de presentar la infección. ¿Puede identificar cuáles individuos están infectados?



5. ¿Cuál frase es correcta para describir la hibridación *in situ*?
a) La técnica permite localizar un segmento concreto de ADN en una posición determinada de un cromosoma eucariótico.
b) Si el marcaje es de tipo quimioluminiscente la técnica se denomina FISH.
c) Consiste en detectar determinados ARNm marcados con fluorescencia, utilizando sondas de ADN marcadas procedentes del cromosoma deseado.

Bibliografía

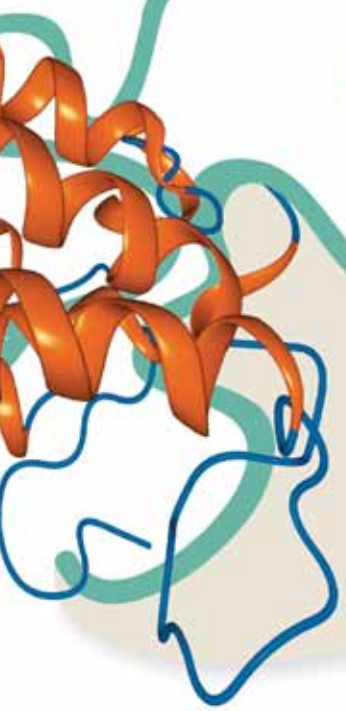
Aussubel F., Brent R.E., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., *et al.*, editores. *Short protocols in molecular biology,* 4ª ed. Nueva York: John Wiley and Sons, 2000.

Carreño V., Castillo I. *Principios de biología molecular,* 1ª ed. Madrid: Springer, 2001.

Peters PM. *Biotechnology: A guide to genetic engineering,* 1ª ed. Dubuque: William C. Brown Publishers, 1993.

Ross J. *Nucleic acid hybridization. Essential techniques.* Londres: John Wiley & Sons, 1998.

Sambrook J., Russell D. *The condensed protocols. From molecular cloning: a laboratory manual.* Nueva York: CSHL Press, 2006.



Capítulo 16

Reacción en cadena de la polimerasa

Ana Soledad Sandoval Rodríguez / Jorge Fernando Floresvillar Mosqueda
Alejandra Meza Ríos

Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera una de las técnicas más sensibles y específicas de las pruebas moleculares. Fue desarrollada en 1986 por el Dr. Kary Mullis, en los laboratorios de CETUR Corporation, en Estados Unidos, lo que le hizo valedor del premio Nobel en 1993. La idea se fundamentó en la necesidad de obtener un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN de manera rápida y económica, los cuales no podían obtenerse por otros métodos hasta ese momento. Esta técnica se basa en una replicación exponencial *in vitro* de una molécula de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc), mediante ciclos repetitivos, que constan de tres temperaturas. En cada uno de los ciclos las moléculas se duplican hasta que los reactivos se agotan.

La longitud del producto amplificado la delimitan los iniciadores, también llamados *primers* u *oligonucleótidos*, de cuyo diseño adecuado depende el éxito de la PCR. Los iniciadores deben ser específicos, no formar estructuras secundarias entre ellos ni hibridaciones inespecíficas entre ellos u otra parte de la cadena.

Características de la amplificación *in vitro* y requerimientos necesarios para la PCR

La amplificación *in vitro* de la PCR se apega a las mismas reglas de la replicación; esto es, se basa en una secuencia que le sirve de molde y, por complementariedad, sintetiza la cadena antiparalela. También, la síntesis de la cadena sigue la dirección 5'-3', ya que requiere de un nucleótido con el extremo 3' libre que proporcione el grupo OH para la adición del siguiente nucleótido, con lo que se forma el enlace fosfodiéster.

Para que se lleve a cabo la PCR se requiere una cadena de ADNg o ADNc que sirva de molde, una enzima ADN polimerasa, cofactores necesarios para la actividad correcta de la ADN polimerasa, desoxinucleótidos (dNTP) para la síntesis del producto de PCR y oligonucleótidos o *primers*. La función de cada uno de estos elementos en la reacción se describe a continuación y se enlistan en la figura 16-1.

ADN polimerasa

En la actualidad, la Taq ADN polimerasa es la enzima más empleada para la PCR; tiene como función polimerizar una nueva cadena de ADN tomando como molde otra ya existente. Debido a que en cada ciclo de la PCR se lleva la mezcla de reacción a temperaturas de 95°C, se requiere de una ADN polimerasa capaz de soportar dichas temperaturas. Anteriormente, esta necesidad se suplía con la adición de *E. coli* en cada ciclo de la ADN polimerasa, que se inactivaba con la temperatura de 95°C, por lo que debía suplementarse de nuevo después de cada paso de desnaturalización (95°C). Sin embargo, el descubrimiento de bacterias habitantes de los géiser, que viven a temperaturas alrededor del punto de ebullición del agua, permitió el aislamiento de la Taq polimerasa de la bacteria *Thermophilus aquaticus*. Con ello, la técnica pudo hacerse más eficiente, pues dicha enzima soporta los 95°C, y la cantidad inicial de enzima añadida a la reacción es suficiente como para suplementar los 25 a 40 ciclos de amplificación. La concentración de Taq polimerasa que se recomienda es de 1 a 2.5 U/reacción de PCR, y su tasa de error en la incorporación de bases es de 4×10^{-4}. Esta enzima es capaz de polimerizar un promedio de 1 000 nt/minuto.

ADN molde

Para la PCR teóricamente se requiere de una sola molécula, cuya secuencia sirva de molde para la amplificación, ya sea de ADN o de ADNg. El ADN se puede obtener de cualquier muestra biológica, y la mayoría de las técnicas de extracción de ácidos nucleicos proveen de moléculas de calidad adecua-

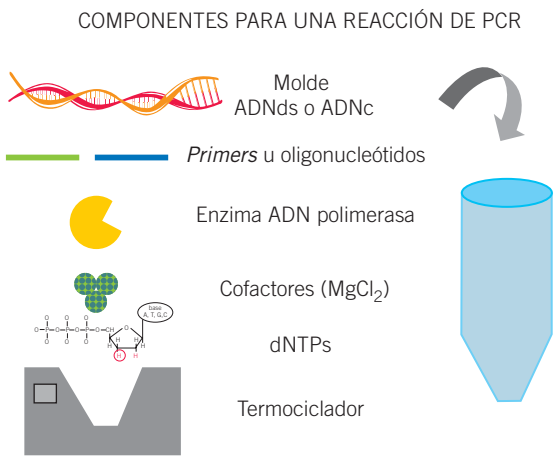


Figura 16-1. Componentes de la reacción de PCR. Para que se lleve a cabo la reacción en cadena de la polimerasa se requiere una cadena de ADNg o ADNc que sirva de molde, una enzima ADN polimerasa, Mn^{+2} o Mg^{+2} necesarios como cofactores para la enzima, dNTPs o desoxinucleótidos y oligonucleótidos para el inicio de la síntesis. Estos reactivos se mezclan y se someten en el termociclador a los ciclos de amplificación.

da para realizar la PCR. Si se quiere amplificar ARN, antes de la PCR se requiere realizar una reacción previa: *la retrotranscripción,* que permite convertir el ARN en ADNc, menos lábil que una cadena de ARN (cabe recordar que la inestabilidad molecular del ARN es elevada por la presencia del grupo OH en el carbono 2' de la ribosa). El ADNc puede manejarse, entonces, con mayor facilidad. Las técnicas actuales empleadas en la PCR permiten realizar la amplificación a partir de 300 ng de ADN genómico, o bien desde 25 a 100 ng en el caso de ADNc o ADN proveniente de genes clonados en vectores. Es importante aclarar que en el caso de la amplificación de ADNc obtenido por retrotranscripción a partir de ARN, durante los primeros ciclos de la PCR se realiza la síntesis de la cadena complementaria del ADNc, lo que permitirá la amplificación de la secuencia como ADN de doble cadena (ADNds) en los ciclos posteriores de la PCR.

Desoxinucleótidos

Para que la polimerasa lleve a cabo su función necesita que existan desoxinucleótidos (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en la mezcla de reacción para poder sintetizar la nueva hebra del ADN. Los desoxinucleótidos libres, cuando no forman cadenas de ácidos nucleicos, se encuentran en su forma trifosfatada, estructura molecular necesaria para su estabilidad y para proporcionar el grupo fosfato con el que se formará el enlace fosfodiéster en la unión nucleótido-nucleótido. Los desoxinucleótidos trifosfatados deben adicionarse en una concentración óptima de entre 50 y 200 µM, cantidad suficiente para sintetizar de 6.5 a 25 µg de ADN. Cantidades mayores de 200 µM pueden producir incorporaciones erróneas, mientras que concentraciones menores de 50 µM se consideran insuficientes para una síntesis adecuada.

Amortiguador

La solución amortiguadora proporciona el pH y concentraciones de sales adecuadas para la correcta función de la ADN polimerasa. Este *buffer* maneja un pH de 8.4 y está compuesto por Tris-HCl y KCl.

Cloruro de magnesio

El magnesio actúa como cofactor de la ADN polimerasa y se suplementa a una concentración de entre 1.0 y 2.5 mM. Esta concentración debe optimizarse de manera experimental para cada PCR, ya que un exceso de magnesio produce una amplificación inespecífica de productos de PCR, mientras que una baja concentración disminuye la producción del amplificado.

Iniciadores

El diseño adecuado de los iniciadores es la clave del éxito de una PCR. Estos oligonucleótidos, con secuencia específica, se utilizan para reconocer por complementariedad secuencias blanco en el ADN molde. En la PCR convencional, se usa un par de iniciadores para delimitar los extremos del producto que se desea amplificar. Su función radica en proporcionar un extremo 3' libre al que se han de añadir los nucleótidos consecutivos mediante enlace fosfodiéster, ya que la ADN polimerasa requiere iniciar la síntesis partiendo de un 3'OH preexistente. A partir de ellos, la ADN polimerasa inicia la polimerización en dirección 5'-3'. Los iniciadores reciben el nombre de *sentido* y *antisentido*, según la secuencia a la que dan origen. El iniciador sentido es complementario y antiparalelo a la cadena 3'-5' del ADN molde, por lo que la polimerasa, al adicionar nucleótidos en él, origina una cadena sentido (5'-3'). En cambio, el **PRIMER** antisentido es complementario y antiparalelo a la cadena 5'-3', por lo que su polimerización originará la cadena 3'-5' (figura 16-2). En la PCR la concentración óptima de los iniciadores es de 0.3 a 1 µM/reacción, ya que un exceso favorecería la formación de dímeros entre dos *primers* parcialmente complementarios, o bien de estructuras secundarias por complementariedad parcial de un *primer* con el mismo, como se aprecia en la figura 16-3.

Diseño de iniciadores y su papel en la especificidad de la PCR

Los iniciadores definen el tamaño del fragmento que se ha de amplificar. El tamaño de los productos a amplificar se encuentra entre 100 y 1 000 pb, aunque se recomienda que sea entre 200 y 500 pb. En caso de que se desee analizar la expresión de un ARN mensajero (ARNm) convertido a ADNc, los *primers* se diseñan de tal forma que uno de éstos hibride en una secuencia exónica y el otro oligonucleótido

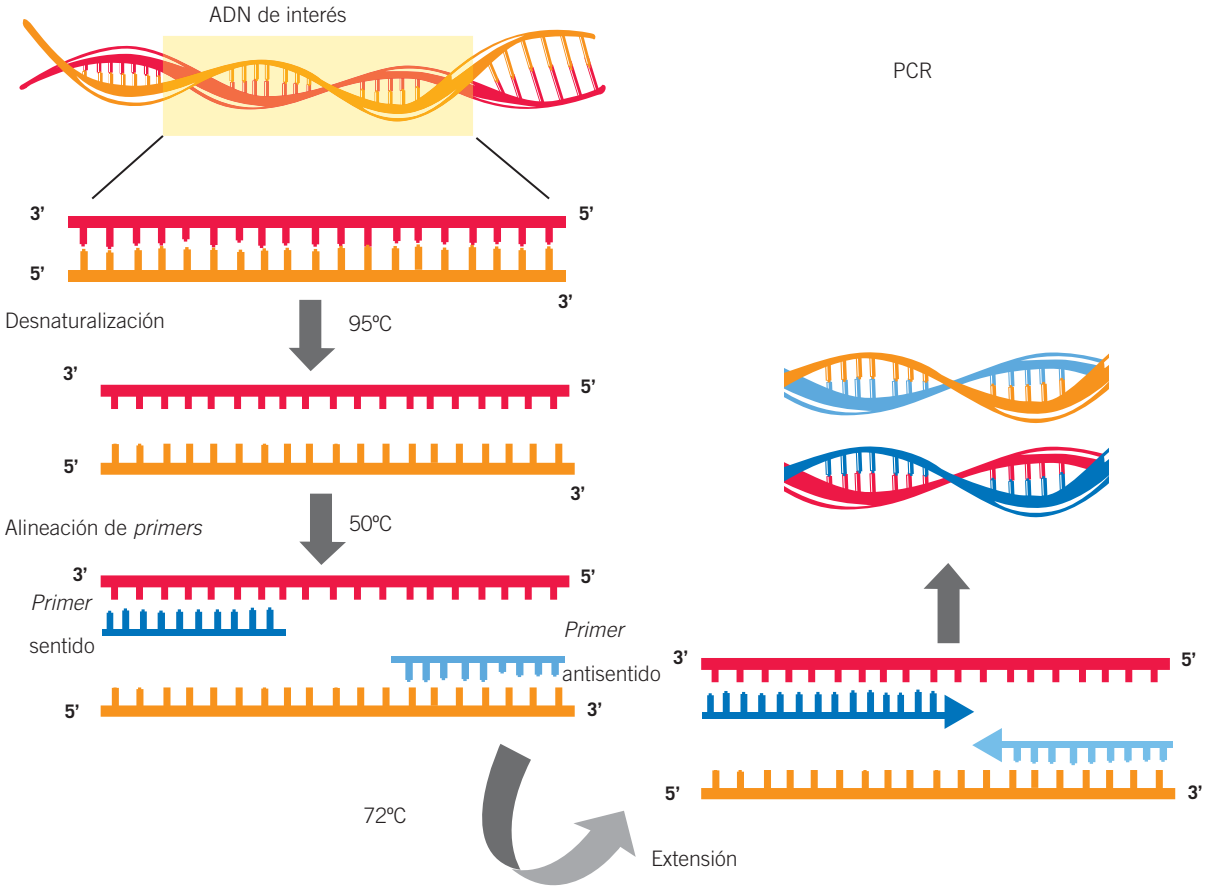


Figura 16-2. Esquema convencional de un PCR. Los ciclos del PCR constan de los pasos de desnaturalización, alineación y extensión. Estos pasos se realizan mediante el cambio automático de temperaturas en un termociclador. La temperatura de desnaturalización permite el rompimiento de los puentes de hidrógeno entre las cadenas del ADN, mientras la temperatura de alineamiento proporciona las condiciones cinéticas favorables para la unión de los iniciadores con su secuencia complementaria. En la temperatura de extensión la enzima polimeriza los dNTPs y forma la cadena complementaria basándose en el molde al cual hibridó el *primer* correspondiente.

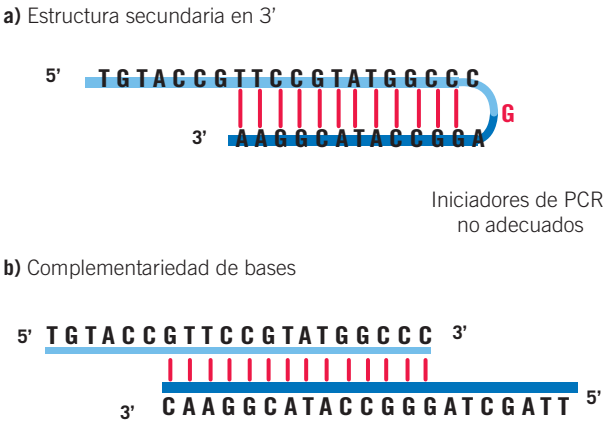


Figura 16-3. Posible secuestro del extremo 3' en los iniciadores de PCR. **a**) Estructura secundaria en 3': generada por complementariedad intrainiciador, generando una estructura plegada de doble cadena que interfiere con el correcto alineamiento del iniciador. **b**) Complementariedad de bases: producida por complementariedad interiniciadores, generando dímeros que afectan la disponibilidad de los mismos en el PCR.

lo haga en otra secuencia exónica; de esta manera, la amplificación del producto del tamaño esperado asegura que sólo los ARNm se han amplificado. En caso deque se haya amplificado también una secuencia de ADNg, (proveniente de contaminación de la muestra de ARN con ADN durante el proceso de extracción), el producto será de un tamaño diferente, ya que tiene secuencias intrónicas de por medio, como se aprecia en la figura 16-4.

La secuencia de los iniciadores debe ser altamente específica para el gen de interés, y procurar un contenido de nucleótidos G-C de 40 a 60% y una longitud óptima entre los 18 y los 30 nt. También debe evitarse un diseño que permita la complementariedad o la formación de estructuras secundarias inter e intra-*primers*, sobre todo cuando estas estructuras secuestran el extremo 3', indispensable para la adición de nucleótidos como se ejemplificó en la figura 16-3.

La secuencia y la longitud de los iniciadores es determinante para su temperatura de fusión (Tm), la cual se define como aquélla a la que el 50% de los iniciadores se encuentra en estructura de cadena lineal. Se procura un diseño tal que

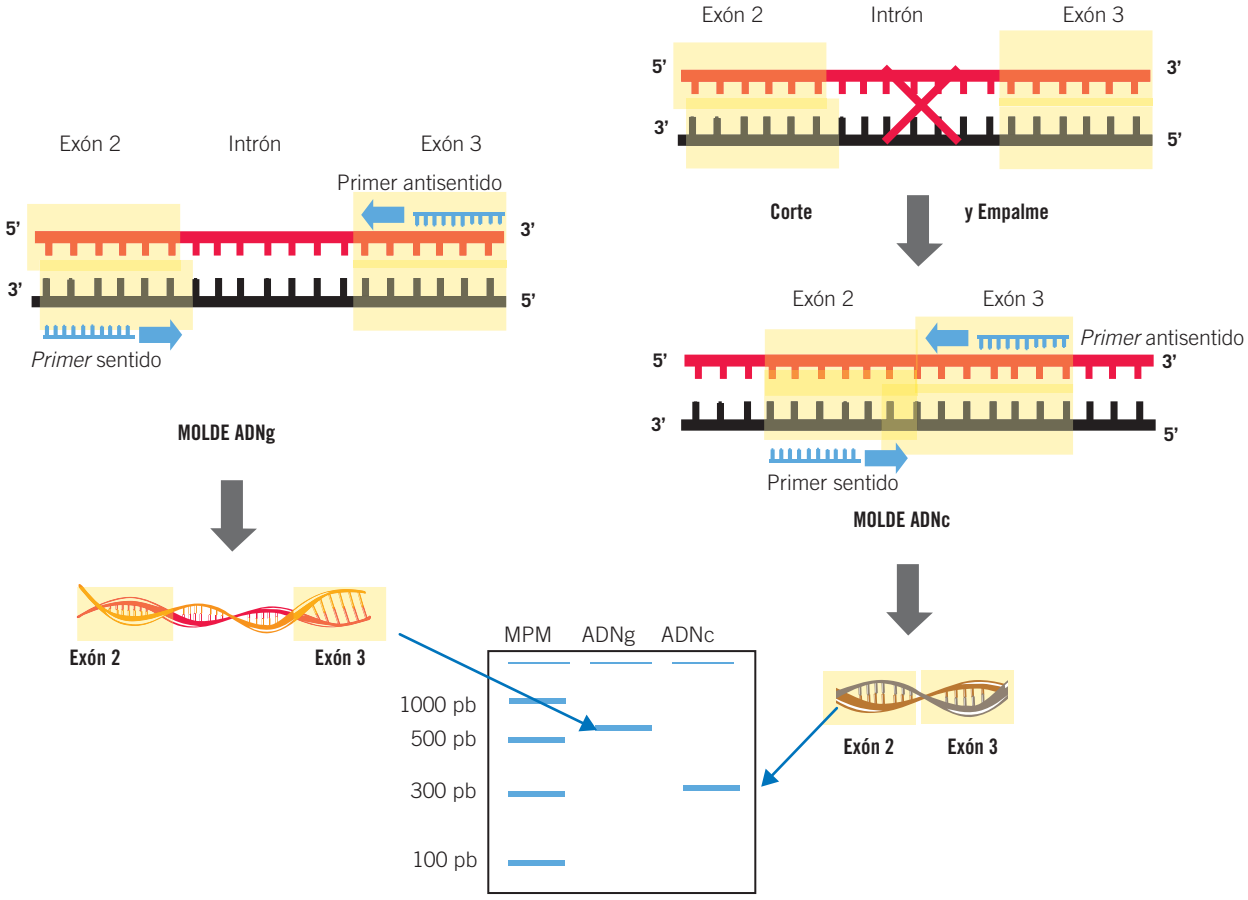


Figura 16-4. Diseño de iniciadores para la discriminación de ARNm y ADNg. Los iniciadores definen el tamaño del fragmento que se ha de amplificar, por lo que si éstos se diseñan para que hibriden en dos exones diferentes, el tamaño que genere el producto de amplificación será mayor cuando el molde sea la molécula de ADNg que contiene la secuencia interexónica, es decir un intrón. Cuando el molde de la reacción de PCR sea el ARNm (ADNc correspondiente), el amplicón será de menor longitud por carecer de la secuencia intrónica.

la Tm de ambos *primers* sea muy similar y no presente más de 5°C de diferencia con la Tm del producto que se va a amplificar, lo cual garantiza temperaturas de alineamiento similares para ambos *primers* y una eficiencia de amplificación adecuada. La Tm aumenta según la longitud del iniciador, por lo que un iniciador por debajo de las 18 nt hibridaría de forma inespecífica en la cadena molde y originaría productos inespecíficos. Por otro lado, iniciadores muy largos requieren de Tm superiores a 65°C; por esto, la longitud óptima está entre los 20 y 30 nucleótidos para que se obtenga una Tm entre 55 y 65°C, compatible con la amplificación de la generalidad de los fragmentos. Existen muchos métodos para calcular la Tm de los iniciadores, pero todos toman en consideración el contenido de nucleótidos, sobre todo G y C, la longitud del *primer* y la concentración de Na^+ en el tubo de la PCR. En la actualidad, muchos programas computacionales permiten el diseño semiautomatizado de los *primers*, tomando en cuenta los parámetros mencionados. Algunos de los programas utilizados son Oligo 6.0, Primer Express®, Primer Desing®, etc. Una vez diseñados, los oligonucleótidos deben verificarse contra alineaciones inespecíficas en la misma secuencia blanco o bien en otras secuencias, empleando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Este *software* coteja una posible hibridación, total o parcial, con alguna secuencia reportada en el Gene Bank que pudiera interferir con la especificidad de los *primers* y su empleo correcto. En caso de hibridación con otras secuencias (ARNm o génicas) reportadas en el banco de genes su diseño debe replantearse.

Esquema de la PCR

En la figura 16-2 se presenta el esquema convencional de una PCR, que incluye los siguientes pasos:

1. Inicio de la desnaturalización.
2. Ciclos de amplificación.
   - Temperatura de desnaturalización.
   - Temperatura de alineamiento.
   - Temperatura de extensión.
3. Amplificación final.
4. Almacenamiento temporal.

Estos pasos se llevan a cabo mediante el cambio automático de temperaturas en un equipo diseñado para este fin denominado *termociclador*.

Termociclador

Es el equipo en el cual se realiza la PCR. Es capaz de cambiar la temperatura de la muestra en cuestión de segundos, lo que por lo general se logra mediante calentamiento/enfriamiento por resistencia eléctrica de una placa metálica, que distribuye la temperatura de manera homogénea durante tiempos programados en el rango de segundos a minutos. Normalmente los rangos de temperatura que abarca el equipo van de 4 a 96°C. Dado que las PCR que se incuban son soluciones acuosas, los equipos cuentan con una placa metálica a manera de tapa, la cual se mantiene a 103°C para evitar la condensación del agua en las tapas de los tubos donde ocurre la reacción. De esta manera, se evita que la concentración de los solutos se modifique, lo que alteraría las condiciones óptimas para la ADN polimerasa y la termodinámica de hibridación de los *primers*. Para el enfriamiento se generan flujos de aire frío, lo que permite descensos de temperatura relativamente rápidos.

Inicio de la desnaturalización

Es necesaria una temperatura de 95°C para la desnaturalización de la doble cadena de ADN, en el caso del ADN genómico, o el rompimiento de estructuras secundarias, en el ADNc. Esta temperatura se mantiene por cinco minutos al inicio de la PCR.

Ciclos de amplificación

Un ciclo típico de PCR convencional consta de las tres temperaturas siguientes:

- 95°C: desnaturalización por unos 30 segundos.
- 55 a 60°C: alineación por 30 a 40 segundos.
- 72°C extensión, según la longitud del producto que se va a amplificar, considerando la adición de 1 000 nucleótidos en 60 segundos.

Este ciclaje de temperatura se repite continuamente por 30 a 35 ocasiones. Cada temperatura cumple con una función específica.

Desnaturalización

Se realiza a 95°C y tiene como objetivo desnaturalizar la doble cadena de ADN y/o destruir las estructuras secundarias del ADN, lo que permite el acceso de los *primers* a la cadena molde en sus secuencias complementarias. Esta temperatura se mantiene por 30 segundos.

Alineación

En esta fase, la temperatura se encuentra en un rango entre 55 y 60°C, en el cual la mayoría de los iniciadores hibridan; esto es, se genera la energía cinética necesaria para que los iniciadores busquen en las cadenas de ADN su secuencia complementaria y formen los puentes de hidrógeno con la cadena molde, dejando el extremo 3'OH disponible y listo para la adición de los nucleótidos consecutivos por la ADN polimerasa.

Extensión

Se produce a la temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa empleada, por lo que dependerá ésta para la PCR. En el caso de la Taq polimerasa, la más utilizada es de 72°C.

Amplificación final

Una vez terminados los ciclos designados para la PCR, la temperatura de extensión (72°C) se mantiene por cinco minutos, lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos a los cuales se encuentra unida.

Almacenamiento temporal

Durante la programación de los ciclos de la PCR se programa también un ciclo final de 4°C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR hasta que se retiren los tubos de reacción del equipo.

Cantidad del producto de PCR: número de copias por cada ciclo según la expresión $p = (2)^{nT}$

Teóricamente, en cada uno de los ciclos de amplificación se duplica la cantidad de producto inicial. Así, el producto de PCR aumenta exponencialmente conforme al número de ciclos de PCR (n). Sin embargo, el producto de PCR depende del número inicial de copias del molde de ADN (T), por lo que se aplica la fórmula que indica que si se parte del doble de moléculas iniciales de ADN se obtendrá el doble de producto:

$$P = (2)^{nT}$$

donde:

P = número de moléculas producto de PCR;
n = número de ciclos;
T = número de copias inicial de la molécula molde.

Por ejemplo, una PCR de 25 ciclos, partiendo de 10 copias de ADN molde, producirá la cantidad de $P = (2)^{25 \times 10}$; o sea, 2^{250}, o lo que es lo mismo, 1.8×10^{75} moléculas.

En la figura 16-5 se presenta un esquema de esta amplificación exponencial.

Sensibilidad de la técnica de PCR

La PCR es una técnica altamente sensible y específica, al alcance de la mayoría de los laboratorios de biología molecular. Bajo las condiciones y diseño de oligonucleótidos apro-

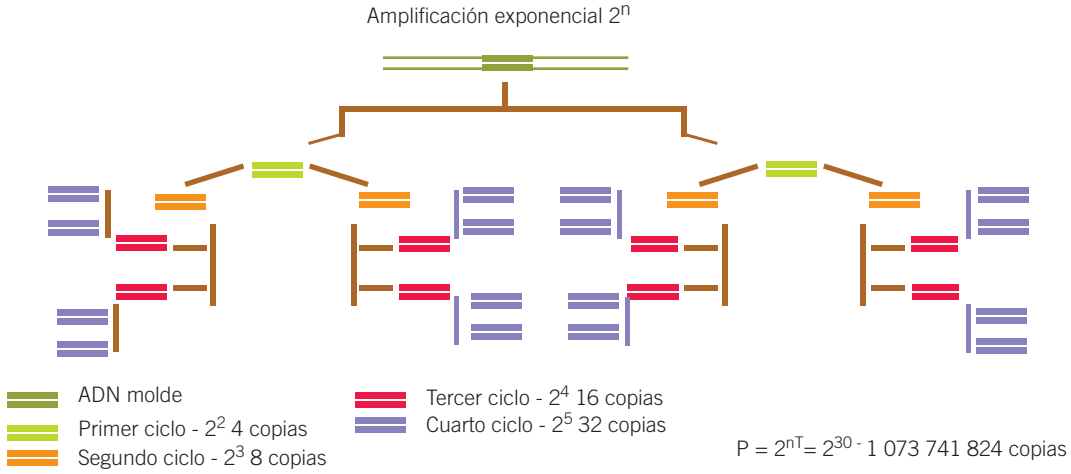


Figura 16-5. Amplificación exponencial del producto de PCR. La amplificación del producto de PCR sigue la fórmula $P = (2)^{nT}$, donde: P = número de moléculas producto del PCR; n = número de ciclos; T = número de copias inicial de la molécula molde. En cada ciclo se duplica la cantidad de producto inicial, por lo que el número de moléculas producto del PCR aumenta exponencialmente conforme avance la reacción.

piados se puede obtener una sensibilidad y una especificidad de 100%. Sin embargo, en experimentación es difícil obtener estos resultados, ya que múltiples factores influyen de manera crucial en el desarrollo de una PCR, como la selección de un sistema adecuado de detección del producto amplificado, el diseño correcto de *primers* y sondas, la calidad de la muestra que se va a amplificar, el control de los inhibidores de la reacción, la contaminación ambiental, la contaminación con otros productos de PCR, la optimización de las condiciones de reacción, la concentración de reactivos, el termociclador empleado, etc. El control y el manejo correcto de cada uno de estos factores influirán en la calidad de la PCR. Esta sensibilidad es su principal característica y desventaja: una PCR puede proporcionar un diagnóstico temprano, pues tan sólo con pocas copias del genoma de un patógeno puede determinarse su presencia. Sin embargo, esta misma característica hace que la realización de una PCR sea una tarea para el especialista y que siempre deba tenerse cuidado de evitar un acarreamiento de material que pueda contaminar la reacción y producir falsos positivos.

Modalidades de la técnica de PCR

Esta técnica ha evolucionado desde su invención. En la actualidad, gracias a los múltiples sistemas de detección, a variantes en los iniciadores y a la cantidad de pares de *primers* empleada se dispone de diversas variantes de la técnica, que se enlistan a continuación:

PCR convencional

Se basa en la detección del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida. El producto amplificado se visualiza mediante una banda (ver el capítulo 12 Electroforesis). La intensidad de la banda se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado y su longitud se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular comercial de longitudes conocidas como se aprecia en la figura 16-6**.** El análisis de imagen de la banda del producto de PCR permite medir su intensidad mediante *software* y realizar una medición semicuantitativa de las bandas de los productos de PCR obtenidos en diversas muestras. La semicuantificación puede ser respecto a cualquiera de las muestras contenidas en el gel, como se observa en la figura 16-7A, en la que el carril 3 muestra una banda tres veces más intensa que la banda del carril 1, pero la mitad de intensa que la banda de la muestra 2. O bien una semicuantificación de las muestras respecto a un gen constitutivo, como se observa en la figura 16-7B. Para este tipo de análisis se mide la intensidad relativa de la banda del producto de PCR del gen de interés y de un gen constitutivo. Se considera un gen constitutivo aquel que tiene una expresión constante, ya que es indispensable para la viabilidad de la célula y esta expresión no se altera por la presencia de alguna enfermedad o variaciones en la condición fisiológica, no varía entre los individuos ni durante el desarrollo (edad) y no se ve afectado por las condiciones del experimento. *GAPDH* (*gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa*), *HPRT* (*hipoxanthine guanine phosphoribosyltransferase*), β-*actina* (*beta-actina*) y *ARNr 18S* (*ARN ribosomal 18S*) son los genes constitutivos más empleados para este tipo de análisis

Con el valor de intensidad relativa de los genes, los datos se normalizan respecto al gen constituido y se calcula un índice:

$$\frac{\text{Intensidad relativa del gen de interés}}{\text{intensidad relativa del gen constitutivo}}$$

Ya que la expresión del gen constitutivo permanecerá relativamente constante, esta relación indica directamente

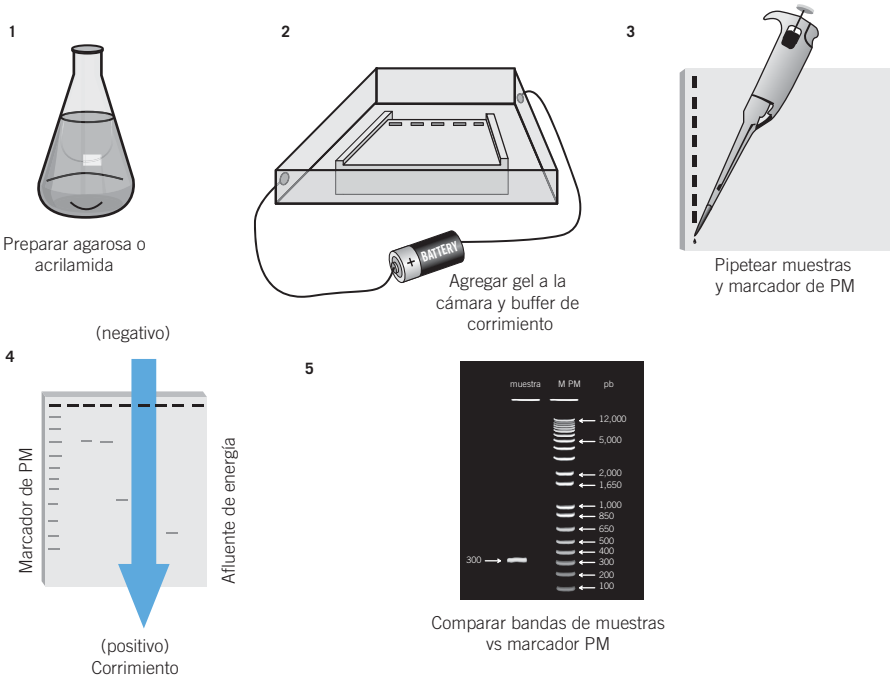


Figura 16-6. Visualización del producto de PCR mediante electroforesis en gel. La detección del producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa se observa como una banda. La intensidad de la banda se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado y su longitud se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular comercial de longitudes conocidas. En este gel el carril marcado MPM corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb *plus ADN ladder*; los valores correspondientes a las bandas se observan en la columna pb (pares de bases). La muestra corresponde a un producto de aproximadamente 300 pb, como se puede apreciar en el carril de muestra.

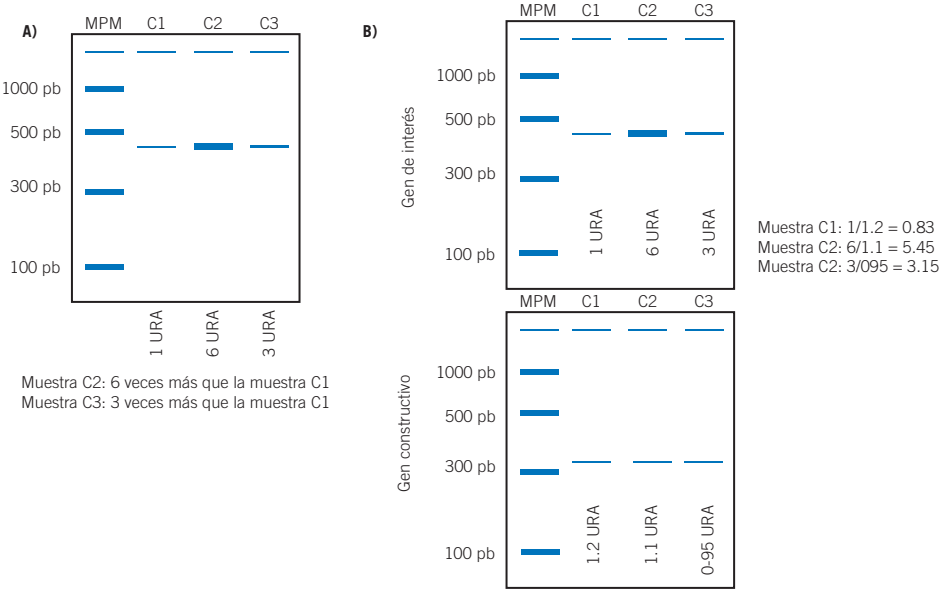


Figura 16-7. Análisis de imagen de la banda del producto de PCR. La intensidad de la banda del producto de PCR se mide mediante un *software*. **A)** Análisis semicuantitativo respecto a una muestra, en el cual las bandas de los productos de PCR obtenidos de varias muestras se comparan respecto a cualquiera de las muestras contenidas en el gel, como en la imagen donde el carril 3 muestra una banda tres veces más intensa que la banda del carril 1, pero la mitad de intensa que la banda de la muestra del carril 2. **B)** Semicuantificación respecto a un gen constitutivo; es aquella en la cual se mide la intensidad relativa de la banda del producto de PCR del gen de interés y de un gen constitutivo para cada una de las muestras, se determina la relación gen de interés/gen constitutivo para cada muestra, y dicha relación se compara entre muestras indicando cuál de ellas expresa más o menos el gen de interés normalizado contra el gen constitutivo.

la variación entre muestras del gen de interés. Esta forma de *semicuantificación* es también posible realizarla con la tecnología de detección en tiempo real empleando los métodos 2ΔΔCt, o el método 2ΔCt, que se describen más adelante.

PCR cualitativa

Esta modalidad de PCR permite detectar la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado. Es decir, sólo reporta si una muestra es positiva o negativa ante la presencia de un determinado ADN. Se emplea para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y sólo permite confirmar la presencia o ausencia de un determinado agente patógeno, esto es, si una persona está o no infectada.

PCR semicuantitativa

Permite conocer los niveles de expresión de un gen (ARNm) en particular, y normaliza los niveles encontrados de este gen con los encontrados en un gen de expresión constitutiva, que se expresa de manera constante en la célula. Al realizar una relación entre la expresión del gen de interés con la expresión del gen constitutivo el índice que se obtenga indicará la expresión real del gen de interés y se reporta como porcentaje de expresión. Esto permite su comparación con otras muestras analizadas de la misma manera.

PCR cuantitativa

En esta modalidad de PCR, el producto de PCR es cuantificable, lo que permite reportar en números absolutos la cantidad de un microorganismo o del ARNm de un gen en una muestra. Para la cuantificación absoluta se amplifica al mismo tiempo una curva con muestras de concentración conocida del ADN que se quiere analizar. Los resultados de las muestras se traslapan a los valores de la curva y de esta manera se conoce la concentración de la muestra.

PCR múltiple (varias regiones o varios genes)

En este tipo de PCR se realiza la amplificación de más de un fragmento de ADN en una sola reacción de PCR con dos o

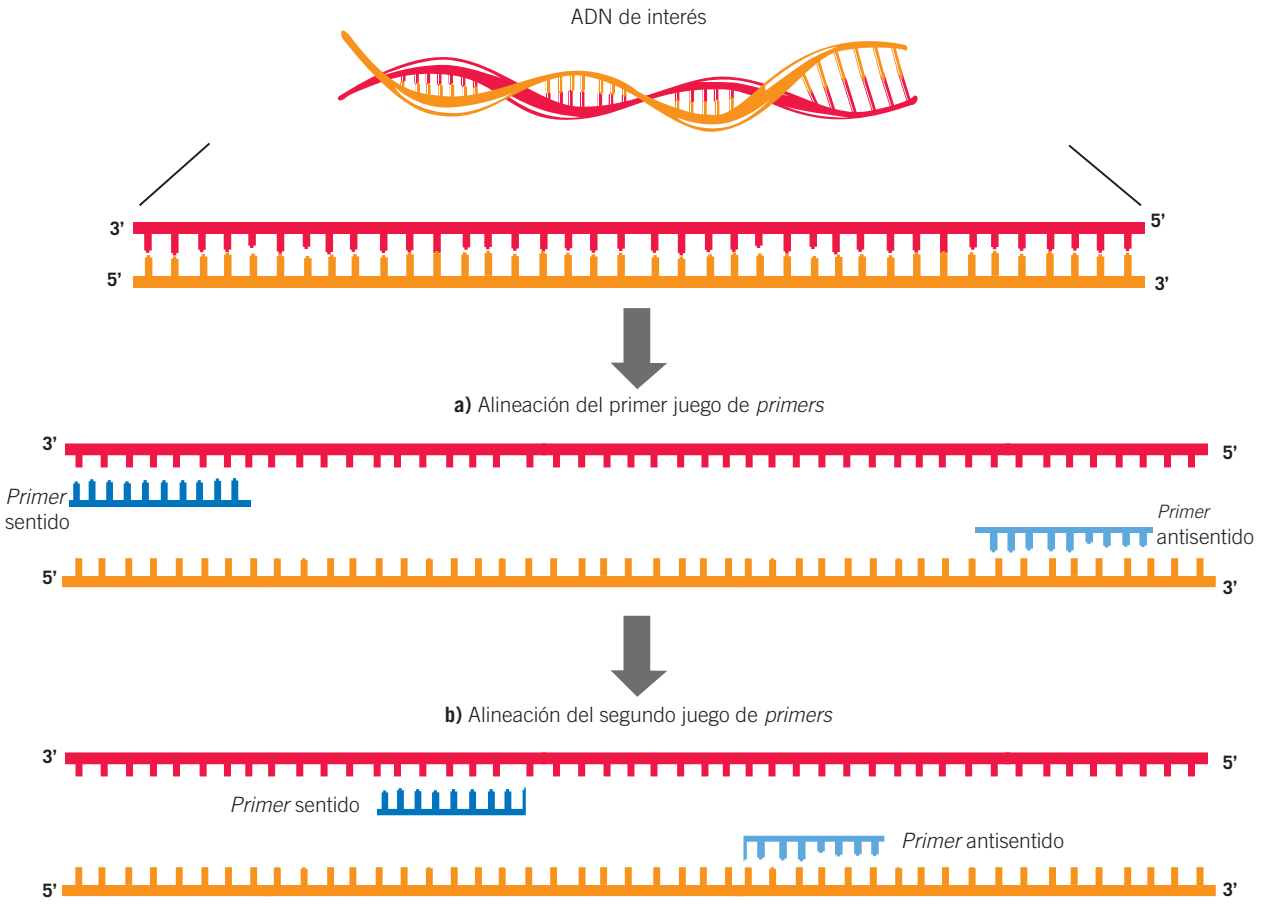


Figura 16-8. PCR anidada. Esta variante de la PCR es más sensible porque amplifica el ADN en dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores en cada una. **a)** La primera reacción de PCR se realiza con un par de iniciadores que amplifiquen una región de ADN extensa. **b)** Una segunda PCR se realiza con el producto de amplificación de la primera PCR como molécula molde con otro par de iniciadores anidados. El producto de amplificación de la PCR anidada será por tanto de longitud más corta que el primer producto de PCR.

más juegos de *primers* (cada juego para un gen en particular). Tiene la ventaja de que ahorra tiempo y reactivos, pero presenta el inconveniente de que el diseño de los *primers* debe ser adecuado para que no se complementen entre ellos (hibridaciones inespecíficas). La PCR múltiple o multiplex puede emplearse para la búsqueda de varias deleciones, mutaciones y polimorfismos en un solo gen o en múltiples. Esta técnica se utiliza para el análisis simultáneo de múltiples marcadores moleculares asociados a alguna enfermedad, para la detección simultánea de varios agentes patógenos, organismos genéticamente modificados, etcétera.

PCR selectiva (detecta genes silvestres o mutados)

Para la PCR selectiva se diseñan *primers* capaces de hibridar solamente en secuencias con presencia de una mutación, por lo que, en caso de estar ausente, no se produce un producto de PCR. Como control se produce una PCR con *primers* diseñados para la amplificación de la forma silvestre del gen, cuyos resultados deben coincidir con los obtenidos con los *primers* que amplifican la mutación. En caso de homocigatos sólo una de las dos reacciones debe resultar positiva, en el caso de heterocigenos ambas reacciones resultan positivas.

PCR in situ

Se realiza en una muestra de tejido embebida en parafina (laminilla) o congelada y cortada en criostato. No requiere extracción del ADN del tejido. En la laminilla se añaden los reactivos necesarios para la PCR y se colocan en un termociclador especial, ya que en lugar de tener orificios para colocar tubos contiene ranuras para colocar las laminillas. Esta modalidad de PCR permite saber qué tipo celular presente en un tejido expresa un determinado gen o cuál célula está infectada por un patógeno.

PCR anidada (nested-PCR)

Esta variante de la PCR convencional proporciona mayor sensibilidad a la técnica, al amplificar las secuencias de ADN en dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores o *primers* en cada una. Esto es, primero se realiza una PCR con un par de *iniciadores externos* para amplificar una región de ADN extensa, que contiene el segmento diana que se desea amplificar. Después, este producto de amplificación sirve de molde para una segunda PCR con otro par de *iniciadores internos* (*primers* anidados) para amplificar una región más pequeña (interna). Por lo tanto, la longitud del producto de amplificación de la segunda PCR, o PCR anidada, será menor que la del primer producto de PCR (figura 16-8).

PCR en punto final

Es aquella en la que el producto de PCR se analiza después de 25 a 35 ciclos en el punto previo a la saturación de la reacción, mediante un gel de electroforesis. Presenta el inconveniente de que diferente cantidad de material de inicio da lugar a una cantidad diferente de producto al final, además de que diferente cantidad de material de inicio da lugar a la misma cantidad de producto al final, de la reacción. La detección en punto final también presenta las desventajas de que depende de la resolución del gel de agarosa, que suele ser baja y no permite detectar pequeños cambios en la concentración; requiere un procesamiento posreacción, y la tinción de bromuro de etidio es semicuantitativa, pues más de una molécula de bromuro de etidio puede unirse a un solo producto de PCR y, por tanto, tiene una precisión pobre y presenta una sensibilidad menor que la PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real

Las desventajas que presenta la PCR en punto final llevaron a los investigadosres a diseñar una tecnología que solventara estos inconvenientes conocida como *PCR en tiempo real*. La reacción de amplificación es la misma, lo que cambia es el método de detección del producto amplificado y su temporalidad. La detección de las copias del producto de PCR se realiza al mismo tiempo que sucede la amplificación, mediante intercalados en el producto de PCR, un láser que detecta fluorocromos acoplados a los *primers* o a una sonda que hibrida en medio de los *primers,* que se degrada y libera su fluorocromo por la acción exonucleasa 3'-5' de la polimerasa. Mediante la detección de la fluorescencia liberada durante la reacción de amplificación puede medirse la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de producto de PCR formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Cabe mencionar que para la técnica de PCR en tiempo real la temperatura de alineación y extensión es la misma, por lo que ambos pasos se unifican. Esto se logra porque la temperatura óptima para la enzima AmpliTaq Gold® es de 60°C, lo que aunado a un diseño de *primers* que permite su alineación óptima a la misma temperatura permite que este paso sea conjuntado y reduce el tiempo de reacción.

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real pueden ser iniciadores marcados por fluoróforos (*primers* LUX —*light uponextension fluorogenic*—), sondas específicas marcadas con fluorócromos (sondas TaqMan) o bien agentes intercalantes fluorescentes, como SyberGreen o SyberSafe.

PCR en tiempo real empleando SyberGreen

Para la detección en tiempo real, puede emplearse un agente intercalante denominado SYBERreen. En este método,

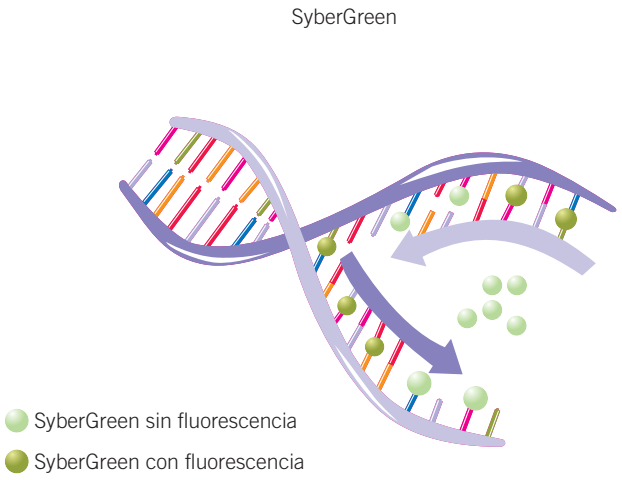


Figura 16-9. PCR en tiempo real con SyberGreen. La detección en tiempo real con SYBERGreen se basa en que esta molécula es un agente intercalante en la doble cadena de ADN que se une de manera inespecífica, produciendo fluorescencia. Al unirse a toda molécula de ADN de doble cadena se puede unir también a dímeros de *primers*, por lo que es poco específico, pero debido a su menor costo es ampliamente utilizado.

muy utilizado por su bajo costo, el fluoróforo se une al ADN de doble cadena de manera inespecífica y produce fluorescencia (figura 16-9). La desventaja estriba en que la unión, al ser inespecífica, será a lo largo de toda la molécula de ADN de doble cadena, incluyendo los dímeros de *primer* que pudieran formarse. El uso de SYBERGreen implica un diseño muy cuidadoso de los *primers* con el fin de evitar la formación de dímeros. La detección del producto amplificado corresponderá a la intensidad de la fluorescencia; sin embargo, ya que varias moléculas de SYBERGreen pueden unirse a una sola molécula de ADNds, se considera un método de cuantificación menos preciso que las tecnologías con *primers* LUX o sondas TaqMan.

PCR en tiempo real con sondas TaqMan

En esta tecnología (de Applied Biosystems), la reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador que realiza, a la vez, la detección de fluorocromos mediante luz láser. En esta tecnología, además de un juego de primers se utiliza una sonda marcada con fluorescencia. La sonda TaqMan® empleada se diseña de manera que hibrida en algún punto intermedio de la secuencia franqueada por el primer sentido y el antisentido. Estos *primers* están diseñados para amplificar fragmentos de entre 60 y 150 pb. La sonda tiene acoplado un fluorocromo en su extremo 5', *silenciado* por otro fluorocromo o *quencher* (referencia pasiva). La sonda hibrida en la cadena molde del ADN que va a ser amplificada y libera su fluorocromo sólo cuando la sonda se degrada por la acción de exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa. Las sondas TaqMan se basan en el método FRET. Este método consiste en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre dos moléculas. Estas moléculas son dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor, y su principio se basa en que una molécula de alta energía cercana a otra de baja energía *(quencher)* promueve una transferencia energética sin emisión de fluorescencia. Una vez que se separan dichas moléculas se emite la fluorescencia, que capta el lector del equipo . Las sondas TaqMan son cortas y para separar las dos moléculas fluorescentes necesitan la rotura de su estructura por la ADN polimerasa con actividad endonucleasa y así liberar la fluorescencia. En esta tecnología se emplea la ADN polimerasa (AmpliTaq Gold®), que se mantiene inactiva por la unión de un anticuerpo y se libera cuando la reacción se incuba a los 95°C iniciales de desnaturalización. Los dNTP empleados contienen dUTP en lugar de dTTP, por lo que los productos de PCR contienen dUTP. La mezcla de reacción contiene uracil-N-glicosilasa (UNG) (AmpErase®). La enzima UNG degradados productos de PCR de reacciones previas, previniendo la contaminación de la reacción de PCR actual con ADN endógenos. Ya que durante los ciclos normales de PCR las altas temperaturas inactivan la UNG, sólo los ADN presentes en la muestra servirán de molde para ser amplificados. Asimismo, el fluorocromo ROX (conjugado de glicina de 5-carboxi-X-rodamina, succinimidiléster) se incluye como referencia pasiva a una concentración final de 500 nM para normalizar la fluorescencia entre reacciones por cualquier posible fluctuación asociada con variación en el volumen. El empleo de este tipo de sondas se esquematiza en la figura 16-10.

PCR en tiempo real con primers LUX

La PCR con *primers* LUX se fundamenta en que uno de los iniciadores se encuentra marcado con un fluoróforo; cuando el iniciador hibrida con la cadena blanco, el fluoróforo es excitado, lo que da como resultado un incremento significativo de la señal de fluorescencia que el láser detecta. Para la amplificación con *primers* LUX se emplea una enzima Taq-Platinum® ADN polimerasa que se activa sólo después del *hot-start* inicial de la PCR (5 minutos a 95°C). De la misma manera que con la tecnología TaqMan, la mezcla de reacción contiene una UNG para prevención de contaminación por acarreamiento. Además, el mix contiene Tris-HCl, KCl, 6 mM de MgCl2, 400 µM de desoxiguanina trifosfato (dGTP), 400 µM de desoxiadenosina trifosfato (dATP), 400 µM de desoxicitidina trifosfato (dCTP), 800 µM de desoxiuridina trifosfato (dUTP), UNG, 1 µM de fluorocromo ROX y estabilizadores. Su empleo se esquematiza en la figura 16-11.

Semicuantificación en tiempo real con el método 2DDCt

En la PCR en tiempo real la concentración relativa se obtiene interpolando todas las muestras en un punto umbral,

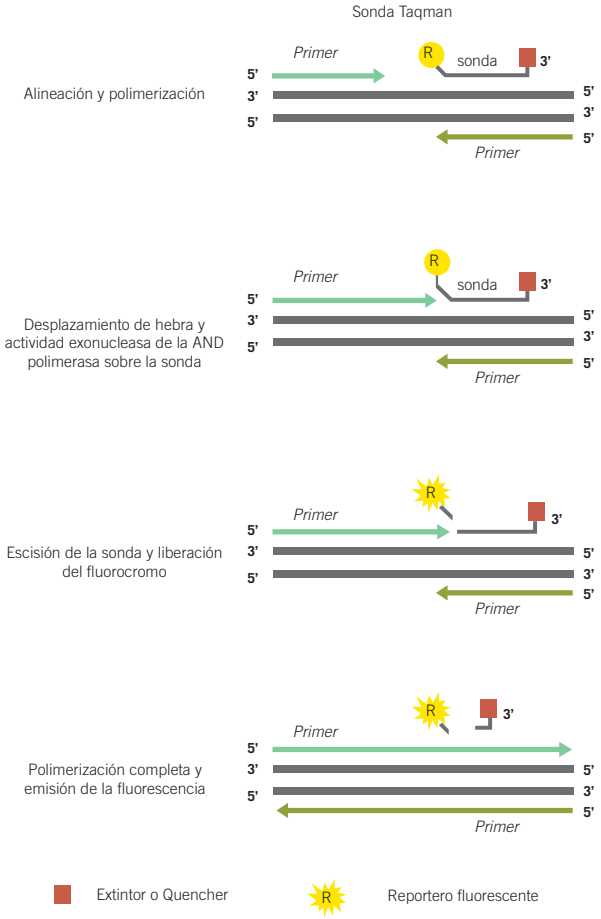


Figura 16-10. PCR en tiempo real con sondas Taqman®. Esta PCR implica el uso de una sonda que hibrida en algún punto intermedio de la secuencia franqueada por el par de *primers* sentido y antisentido. La sonda tiene acoplado un fluorocromo en su extremo 5', el cual está silenciado por otro fluorocromo llamado extintor o quencher en el extremo 3' de la sonda. La amplificación de la cadena donde la sonda está unida libera el fluorocromo sólo cuando la sonda es degradada por la acción exonucleasa de la ADN polimerasa, lo que asegura que sólo habrá detección cuando un producto de amplificación haya sido generado.

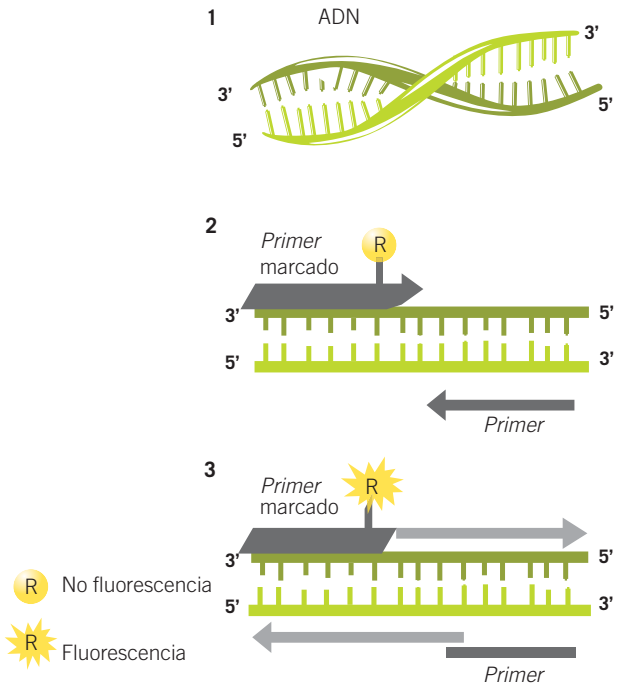


Figura 16-11. PCR en tiempo real empleando iniciadores LUX. La detección del producto amplificado se fundamenta en que uno de los iniciadores está marcado con un fluoróforo; cuando el iniciador hibrida con la cadena blanco y se realiza la polimerización, el fluoróforo es excitado, resultando en un incremento de la fluorescencia, lo que es detectado por el láser.

ciclo de corte o *cyclethreshold* (CT). El CT es el ciclo elegido por el usuario de la fase exponencial en donde la cantidad inicial de moléculas del gen de interés presentes en una muestra es inversamente proporcional a la intensidad de fluorescencia. El CT permite discriminar el comportamiento de las muestras, ya que a un menor valor de CT existe mayor cantidad inicial de moléculas del gen de interés en una muestra. El CT lo determina un *software* a un umbral de fluorescencia fijo *(threshold)* seleccionado por el analista, como se expone en la figura 16-12. Estos valores pueden relacionarse con una curva estándar para determinar la cantidad de moléculas de ADN existentes (cuantificación absoluta) o con un grupo de referencia (cuantificación relativa). La cuantificación relativa puede utilizarse para determinar la expresión de los niveles de ARNm de un grupo de células o tejidos respecto a una referencia (control o condición experimental). Para la cuantificación relativa debe tenerse en cuenta que todas las muestras provienen de individuos diferentes; por tanto, debe realizarse un procedimiento conocido como *normalización,* con un gen control endógeno (constitutivo), para eliminar la variabilidad entre muestra y muestra. El cálculo se realiza mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relativo a un grupo que se considera calibrador. Donde:

ΔCT = CT promedio del grupo de muestras para el gen de interés – CT promedio del grupo de muestras para el gen constitutivo;
$\Delta\Delta CT = \Delta CT$ grupo calibrador – ΔCT grupo de interés.

Por tanto, después de la normalización de los datos respecto al gen constitutivo (ΔCT) se selecciona un grupo que funciona como calibrador del experimento y los datos del resto de los grupos se comparan con el grupo calibrador tendrá el valor de 1 y el resto de los grupos, un valor menor o mayor lo que proporciona un valor semicuantitativo.

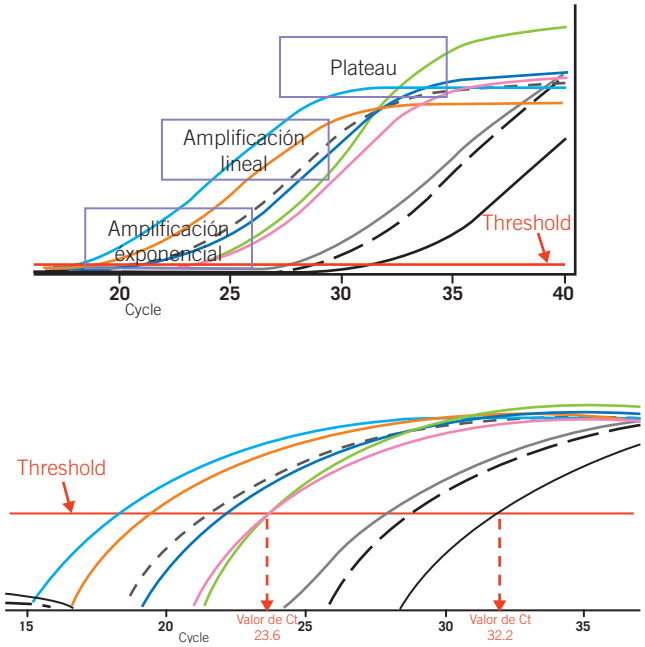


Figura 16-12. Gráficas de PCR en tiempo real. La interpretación de datos en la PCR en tiempo real se realiza interpolando todas las muestras en un ciclo de corte o *cyclethreshold* (CT). El CT es aquel ciclo presente en cualquier punto de la fase exponencial de amplificación en donde la cantidad inicial de moléculas del gen de interés presentes en una muestra determinada es inversamente proporcional a la intensidad de fluorescencia. El CT permite discriminar el comportamiento de las muestras, ya que a un menor valor de CT existe mayor cantidad inicial de moléculas del gen de interés en una muestra. El CT es determinado por un *software* a un umbral de fluorescencia fijo "*Threshold*" seleccionado por el analista.

Semicuantificación en tiempo real con el método 2ΔCt

Este método de semicuantificación para muestras procesadas en tiempo real se realiza cuando no se desea tomar un grupo de muestras como referencia, como cuando la muestra se desea comparar frente a ella misma en diferentes condiciones. La fórmula se aplica:

ΔCT = CT promedio de la muestra para el gen constitutivo – CT promedio de la muestra para el gen de interés.

PCR cuantitativa mediante la tecnología en tiempo real

Para una PCR cuantitativa se emplea la metodología en tiempo real y una curva con estándares de concentración conocida. Esta curva debe tener en cuenta que el ADN o ARN que se emplee debe estar diluido de manera precisa, y en el caso particular de ARN se asume que la eficiencia de retrotranscripción ha sido la misma para todas las muestras. La curva estándar se construye a partir de concentraciones conocidas de un plásmido que contiene clonado el cADN de la muestra a analizar. Debe asegurarse que la eficiencia de la PCR sea la misma para la muestra y para el estándar. Las diferentes diluciones de la curva presentarán CT proporcionales a la cantidad de muestra, y mediante la fórmula de regresión lineal ($y = mx + b$), interpolando los valores de las muestras en el gráfico obtenido se puede conocer la concentración absoluta de las muestras.

Retrotranscripción como paso previo a la PCR

La retrotranscripción es una reacción para la conversión del ARN en ADNc y en general se lleva a cabo antes de una PCR, cuando se pretende analizar secuencias de ARN. La realización consecutiva de una retrotranscripción y una PCR se conoce como RT-PCR. Esta técnica es una variante de la técnica convencional de PCR, con el objetivo de amplificar un ARN específico para evaluar su expresión o presencia. Esta técnica es más sensible y rápida que otras técnicas de análisis de la expresión de genes (Northen blot, Dot blot, Slot blot, ensayos de la nucleasa) y se basa en el uso de transcriptasa inversa de los retrovirus cuya función es sintetizar ADN a partir de ARN (figura 16-13).

En la reacción de retrotranscripción una cadena de ARN se transcribe a ADN de secuencia complementaria al ARN, por lo que se le denomina ADNc. La transcriptasa inversa más empleada es la del M-MLV *(Murine-Moloney leukemia virus)*. Además del ARN molde, que se convertirá en ADNc, se requieren *primers*, generalmente hexámeros formados de secuencias aleatorias de 6 nt. Estos hexámeros hibridarán con las secuencias complementarias a ellos, que se localizan por azar en todos los ARN presentes en la muestra. Para la reacción se requiere también un inhibidor de ARNsas (RNAsin®, RNAseout®), un componente enzimático que impide la acción de estas enzimas que puedan estar presentes en la muestra. Los dNTP (A, G, C, T) se emplearán en la síntesis de las cadenas de ADNc, mientras que una solución amortiguadora proporcionará las condiciones de pH y cofactores necesarios para un funcionamiento óptimo de la retrotranscriptasa. A diferencia de lo que sucede en la PCR, en esta reacción no se requieren ciclos, y basta con una hora a la temperatura óptima de la enzima para realizar la conversión del ARN a ADNc (para la M-MLV son 37°C). Los pasos de que consta esta reacción son desnaturalización del ARN a 70°C por 10 minutos para eliminar estructuras secundarias, alineación de los hexámeros por 10 min a 25°C y polimerización por la retrotranscriptasa a 37°C por una hora. Una vez obtenida la cadena de ADNc, ésta se emplea como molde para la técnica de PCR. Este método se utiliza principalmente para detectar genomas virales compuestos por ARN (como la influenza A, el VIH y la hepatitis C), así como para cuantificar ARNm de cualquier proteína expresada en un tejido.

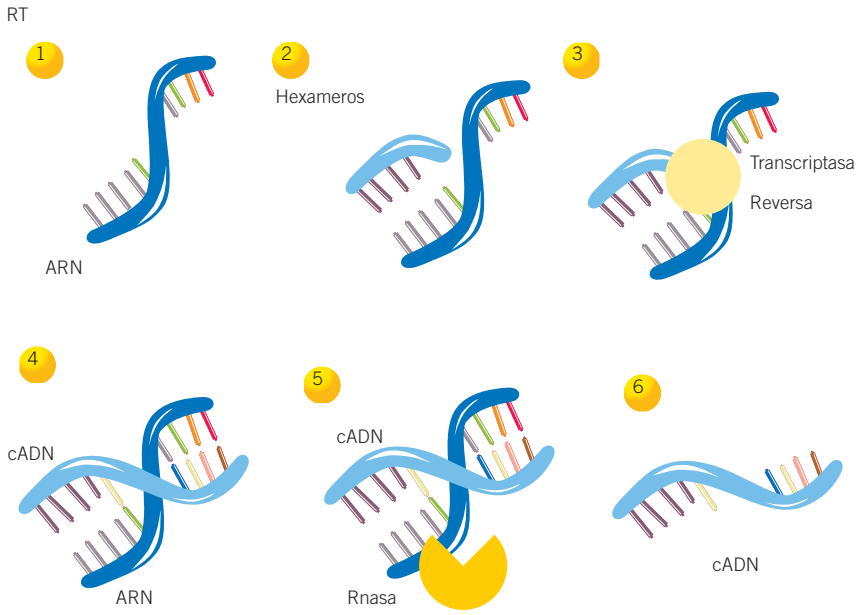


Figura 16-13. Reacción de retrotranscripción. Las moléculas de ARN son retrotranscritas a ADNc. En la reacción participa una transcriptasa reversa que polimeriza los dNTPs. Se requiere además del RNA molde que será convertido a ADNc, hexámeros aleatorios de 6 nt que funcionen como iniciadores de la retrotranscripción e inhibidores de ARNsas mientras se realiza la síntesis del ADNc. Una vez concluida la transcripción inversa el ARN será degradado por las ARNsas del medio y las moléculas de ADNc servirán de molde a la reacción de PCR.

Aplicaciones de la PCR

Los productos de PCR pueden utilizarse para la secuenciación, detección de patógenos infecciosos (virus bacterias, hongos), amplificación de segmentos para su análisis mediante *ADN finger-printing*, o huella deADN, en medicina forense, detección de mutaciones, análisis de la expresión génica o determinación de carga viral, entre otras muchas aplicaciones.

Diagnóstico como aplicación de la PCR

La PCR se encuentra al alcance económico de la mayoría de los laboratorios y en los últimos 20 años se ha convertido en una técnica indispensable para el diagnóstico médico. Con ella se pueden amplificar segmentos que contienen una mutación conocida (diagnóstico) o bien mutaciones desconocidas que se secuenciarán y determinarán después de una PCR. Esto ha sido de gran ayuda para el diagnóstico y la correlación de variaciones génicas con enfermedades. En cuanto a las enfermedades adquiridas, la detección de genomas de patógenos es la aplicación diagnóstica más empleada de la PCR. Debido a su alta sensibilidad, permite la detección aun de pocas copias del genoma, lo que suele suceder en los periodos iniciales de la infección; por lo tanto, la PCR permite un diagnóstico temprano.

Ejercicio de integración 1

1. La enfermedad de Parkinson (EP) se considera la segunda enfermedad neurodegenerativa en cuanto a prevalencia, y afecta de 1 a 2% de las personas en edad madura. Es de origen multifactorial, por interacción de factores ambientales y uno o más genes que confieren susceptibilidad. Los pacientes con esta afección presentan un 80% de muerte neuronal; y se ha observado que en el citoplasma de las neuronas sobrevivientes hay inclusiones proteicas de α-sinucleína, codificada por el gen *SNCA*, conocidos como cuerpos de Lewy.

Diversos polimorfismos en este gen se han relacionado con EP dominante, esporádica y en otras formas de demencia, con alteraciones en los cuerpos de Lewy, por lo que se propone que estos polimorfismos pueden afectar la agregación proteica e influir en el desarrollo de EP (Ramírez-Jirano L.J., 2006).

Para estudiar la posible vinculación del polimorfismo, 116C-G, se requiere la búsqueda del genotipo en pacientes con EP y en individuos sanos, mediante la técnica de PCR y la posterior digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR.

El fragmento del gen en el cual se encuentra la parte polimórfica de la α-sinucleína es:

91

↓

5'- CGCGGAAGTG AGGTGCGTCG GGGCTGCAGC GCAGACCCCG GCCCGGCCCC TCCGAGAGCG TCCTGGGCGC TCCCTCACGC CTTGCCTTCA AGCCTTCTGC - 3'

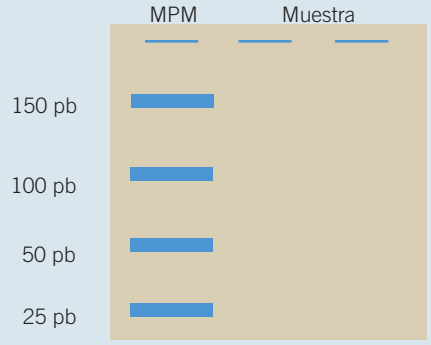
a) Si la secuencia del iniciador es de 20 pares de bases y uno de ellos hibrida en la posición 91, y el fragmento a amplificar es de 65 pb, escriba el iniciador sentido y antisentido:

1. Sentido:
5'– – 3'

2. Antisentido:
5'– – 3'

b) Escriba el amplicón de ADNds resultante, indicando los extremos 5´-3´y la ubicación de los iniciadores sentido y antisentido.

c) En la siguiente esquematización de un gel de electroforesis indique con una banda dónde aparecería el producto de PCR según su longitud.



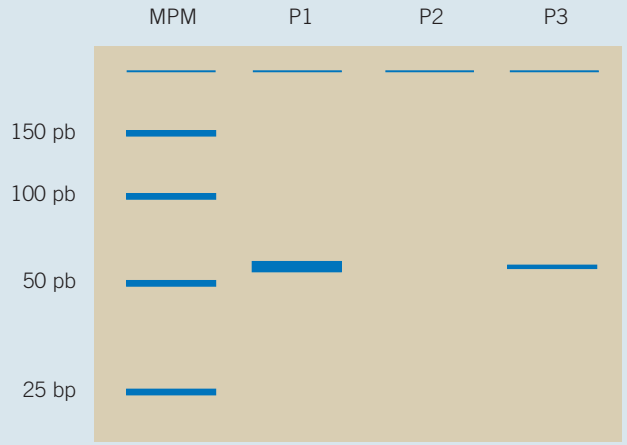
Ejercicio de integración 2

Complete las frases del tema de PCR, RT y modalidades de PCR con las siguientes palabras:
Iniciadores, ARN, PCR en tiempo real, constitutivo, curva estándar ADN polimerasa, transcriptasa inversa, uracil-n-glicosilasa, punto final, electroforesis, desnaturalización, ADNc

1. De una reacción de retrotranscripción *in vitro* se obtiene: _____
2. Extracción de _____ de la muestra es el primer paso para la realización de una RT-PCR
3. Por la acción de la _____ se obtiene una molécula de ssADNc.
4. La _____ utiliza las cadenas sencillas de ADNc como molde para la síntesis de moléculas de cadena doble
5. El _____ se inserta en vectores de clonación y se someten al proceso de clonación.
6. Los _____ son los reactivos clave para una PCR específica.
7. La _____ es una modalidad de PCR que emplea sondas TaqMan.
8. Se denomina gen _____ a aquel cuya expresión no se modifica con las condiciones experimentales.
9. La PCR cuantitativa requiere forzosamente la interpolación de las muestras contra una _____
10. La modalidad de _____ presenta el inconveniente de que la diferente cantidad de material de inicio da lugar a la misma cantidad de producto final debido a la saturación.
11. A la temperatura de _____ se destruyen estructuras secundarias del ADNc y corresponde a los 95°C.
12. La enzima _____ elimina los residuos de uracilo del ADNss o ADNds previniendo que amplicones sirvan de molde en una PCR posterior.
13. La visualización del producto de amplificación se realiza mediante una _____

Ejercicio de integración 3

La PCR para la detección del genoma del VHB genera un amplicón de 325 pb. Interprete el siguiente gel obtenido tras procesar el suero de tres pacientes sospechosos de portar la infección.



1. ¿Cuál paciente (o pacientes) porta el genoma del VHB en su sangre?
2. ¿Cuál paciente (o pacientes) es negativo a la infección?
3. ¿Cómo interpreta el hecho de que la banda de P1 sea más intensa que la banda de P3?

Bibliografía

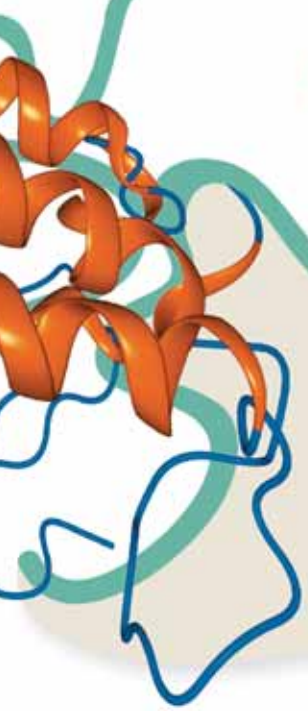
Edwards M.C., Gibbs R.A. *Multiplex PCR: advantages, developments and applications.* Houston: Institute for Molecular Genetics, Baylor College of Medicine, Feb, 2011.

Hunt M. *Real time PCR tutorial.* The Board of Trustees of the Columbia: University of South Carolina, 2006.

Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. *PCR strategies.* Nueva York: Academic Press, 1995.

Löffert D., Karger S., Twieling G., Ulber V., Kang J. *Optimizing of multiplex PCR.* Hilden: QIAGEN GmbH, Núm 2, 1999.

Mackay I.M., Arden E.K., Nitsche A. *Real-time PCR in virology.* Nucleic Acids Res, 2002;30:1292-1305.



Capítulo 17

Secuenciación del ADN y microarreglos

Belinda Claudia Gómez Meda / Guillermo Moisés Zúñiga González
José María Vera Cruz / Bertha Adriana Álvarez Rodríguez

Introducción

A pesar del papel tan importante que desempeña la secuencia de ADN en la materia viva, el desarrollo de los métodos para su determinación es relativamente reciente, debido sobre todo al tamaño tan grande de las moléculas de ADN en las células.

En los decenios de 1960 y 1970, dos grupos de investigación independientes, liderados por los británicos Frederick Sanger y Alan Coulson y los estadounidenses Alan Maxam y Walter Gilbert, idearon de manera prácticamente simultánea dos procedimientos diferentes para determinar de modo directo la secuencia del ADN. Estos métodos sólo requieren de pequeñas cantidades de ADN, son altamente confiables y han revolucionado la biología molecular. En la actualidad, el equipo automatizado hace que la secuenciación sea un procedimiento rápido y de rutina en los laboratorios (figura 17-1).

Secuenciación

Método químico o de degradación de Maxam y Gilbert

Es un método de secuenciación que depende de la degradación química específica del ADN que describieron Maxam y Gilbert, en 1977. Este método tiene la ventaja de que puede emplear ADN de doble hebra, pero requiere una separación de hebras o fraccionamiento equivalente por cada fragmento de restricción estudiado, lo cual lo hace laborioso.

La fragmentación específica del ADN es la base de este método, desarrollado en cinco pasos, que a grandes rasgos implican el marcaje radiactivo del extremo 5' con ^{32}P, la modificación de una base, la eliminación de la base modificada, rotura de la cadena de ADN en la desoxirribosa modificada y el análisis de la secuencia fragmentada por electroforesis en gel de poliacrilamida. El método está limitado por el poder de resolución del gel de poliacrilamida que, en el contexto histórico de la época, permitía secuenciar aproximadamente 100 bases a partir del punto de marcaje.

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica, según la técnica que se use. La electroforesis en gel en general se utiliza con propósitos analíticos, pero puede ser una técnica preparativa para purificar parcialmente moléculas antes de aplicar espectrometría de masas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación o secuenciación de ADN (para mayores detalles, consultar el capítulo relacionado).

Antes del tratamiento químico que genera el corte, se marca un fragmento de doble hebra producido por digestión con una enzima de restricción (fragmento de restricción) de una determinada longitud en sus dos extremos; primero, se trata con fosfatasa alcalina para eliminar el fosfato terminal en su extremo 5', y después, se añade un fosfato marcado con ^{32}P para producir una hebra marcada de forma terminal. La fragmentación selectiva de una cadena de ADN marcada se consigue con el uso de cuatro tratamientos químicos independientes, cada uno de los cuales está diseñado para producir patrones específicos de rotura y observación mediante autorradiografía. El procedimiento consiste en "atacar" químicamente al ADN con reactivos que primero dañan y después eliminan una base del nucleótido. La desoxirribosa expuesta es, entonces, un punto débil en el esqueleto de la cadena y es susceptible de roturas. Posteriormente, se llevan a cabo reacciones químicas para desprender completamente la desoxirribosa de los enlaces 5' y 3' de sus fosfatos, y la reacción es tan específica que permite dañar sólo uno de los residuos a lo largo de pocos pares de bases del ADN. El reactivo específico para purinas es el dimetilsulfato, mientras que el reactivo para pirimidinas es la hidracina.

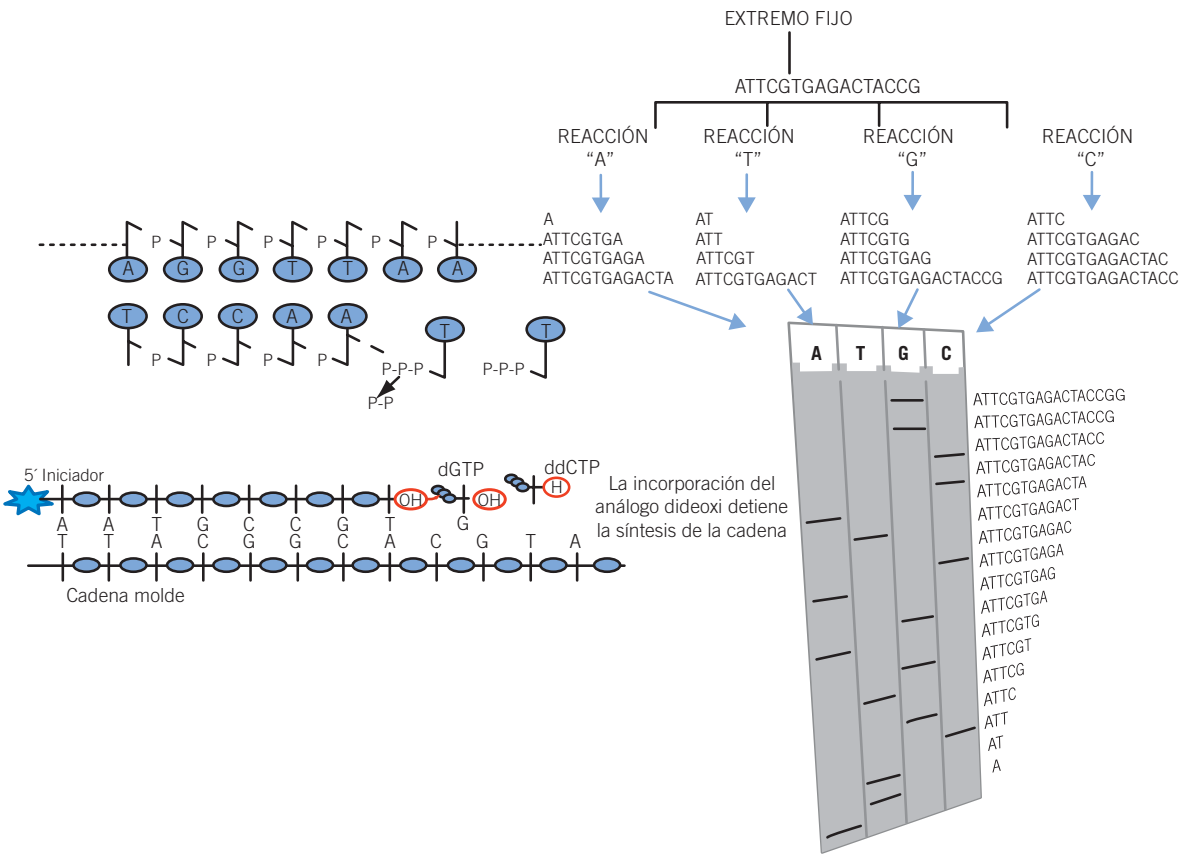


Figura 17-1. Estrategia general de secuenciación de ADN. Los métodos de secuenciación se basan en la síntesis de ADN, en cuatro reacciones en paralelo, una para cada nucleótido, a fin de producir el paro de la reacción cuando un ddNTP se añada a la reacción. Los ddNTP pueden marcarse diferencialmente con fluorocromos de diferente color. Se obtendrá la secuencia de la cadena complementaria a la cadena molde por autorradiografía o fluorescencia, leyendo de abajo hacia arriba (5' → 3').

Debido a que el enlace glucosídico de una purina metilada es inestable y se rompe fácilmente, las bases pueden eliminarse calentando las hebras a pH neutro, dejando la desoxirribosa libre. El tratamiento que de preferencia rompe residuos guanílicos se basa en un álcali suave a 90°C (NaOH 0.1 M), que libera completamente los restos de desoxirribosa despurinados de los grupos fosfato adyacentes en sus enlaces 3' y 5', o ácido fórmico para corte en bases púricas indiferenciado (A + G), mientras que para los residuos adenílicos el tratamiento es a 0°C en condiciones ligeramente ácidas (HCl 0.1 M). Cuando los fragmentos marcados en su extremo se resuelven en gel de poliacrilamida, la autorradiografía contiene un patrón de bandas oscuras y claras. Las bandas oscuras se generan del rompimiento de guaninas, que se metilan cinco veces más rápido que las adeninas. Este patrón de guanina/fuerte y adenina/débil contiene, al menos, la mitad de la información necesaria para la secuenciación; sin embargo, en la interpretación de estos patrones puede haber ambigüedad, ya que la evaluación de la intensidad de las bandas aisladas no es sencilla. Para determinar las bases de forma diferencial se compara la información que contiene esta columna del gel con una en paralelo en la cual se suprime el rompimiento de guaninas, lo que permite que las adeninas se evidencien.

La evidencia de corte de adeninas se basa en que los enlaces glucosúricos de las adenosinas metiladas son menos estables que las de las guanosinas, de manera tal que de preferencia las adeninas se liberan con un tratamiento suave con ácido diluido. Subsecuentemente, el rompimiento con álcali producirá un patrón de bandas oscuras correspondiente a las adeninas y con bandas claras para las guaninas.

Para el caso de detección de pirimidinas, la reacción con hidracina producirá roturas en posiciones ocupadas tanto por citosina como por timina. La reacción se repite en presencia de NaCl 2 M, la sal suprime la reacción de la hidracina con la timina, tal que en la autorradiografía sólo se detectan fragmentos cortados mediante tratamiento con piperidina en posiciones ocupadas por citosinas. Cuando se comparan los patrones autorradiográficos de C y C + T, la banda oscura (correspondiente a la marca del radioisótopo) que aparezca en ambas radiografías indicará rotura en la C, mientras que un enlace sólo presente en C + T representará la rotura en una T.

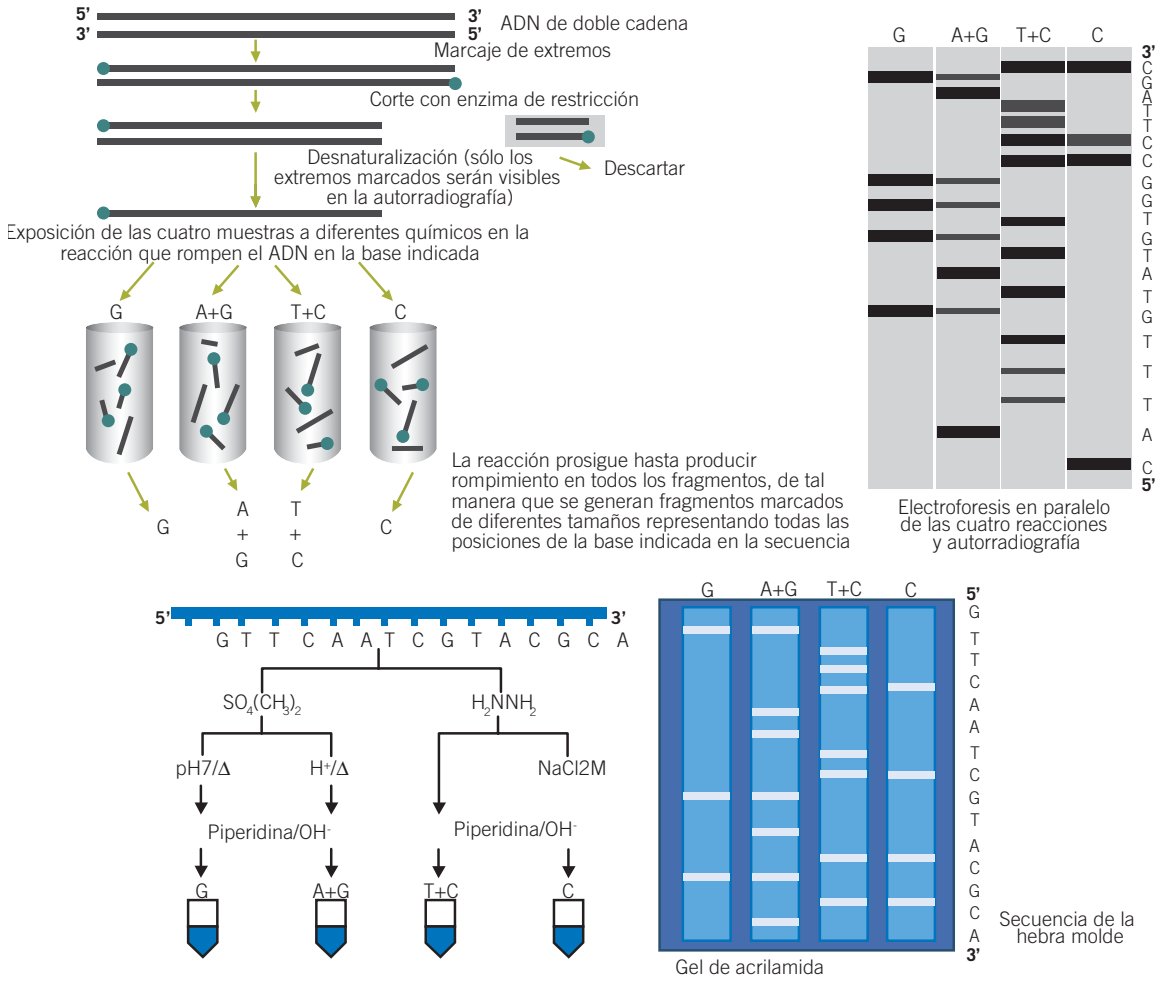


Figura 17-2. Método de secuenciación químico de Maxam-Gilbert. En la secuenciación química la última base que se va agregando a la lectura de la secuencia de cada fragmento generado indica la base que fue químicamente modificada y después eliminada del fragmento durante la reacción de rotura mediada por la piperidina, es decir, la base que se indica es la que en realidad falta.

Para lograr el corte en citosinas y timinas, la hidracina reacciona con timina y citosina, cortando la base y dejando ribosilurea. La hidracina puede reaccionar para producir hidrazona. Después de una lisis de hidracina parcial en solución acuosa de hidracina 15 a 18 M a 20°C, el ADN se corta con piperidina 0.5 M. La amina cíclica secundaria, así como la base libre, desplaza todo el producto de la reacción con hidracina de la desoxirribosa y cataliza la eliminación de β-fostatos. El patrón final contiene bandas de intensidad similar para los cortes en citosinas y timinas.

Cuando se analiza el patrón autorradiográfico de un gel de secuenciación obtenido de los cuatro tratamientos químicos, si se considera una secuencia de carriles con A, G, C y C + T, una banda fuerte en la primera columna con una banda débil en la segunda genera una A; una banda fuerte en la segunda columna con una banda débil en la primera columna es una G; una banda que aparezca en la tercera y cuarta columnas es una C, y una banda solamente en la cuarta columna es una T (figura 17-2). Para obtener la secuencia de una hebra sencilla se comienza en la parte baja izquierda y se lee hacia arriba; así, la secuencia que se lee de abajo hacia arriba es la correspondiente a 5' → 3' de la hebra original de ADN analizada. La sencillez de este método radica en que sólo se necesitan cuatro radiografías para establecer la secuencia de ADN.

La secuenciación química tiene ventajas específicas. En primer lugar, los tratamientos químicos son sencillos de controlar; el ataque químico ideal, una base eliminada por hebra, produce una buena distribución de materiales marcados a través de la secuencia. En segundo lugar, cada base es atacada, tal que en un corrimiento se desplegará cada base individual. La distinción química entre cada base es clara y la secuencia de ambas hebras permite un chequeo más adecuado. Estas reacciones específicas fueron elegidas para proveer información más que suficiente para la secuenciación. En principio, podría secuenciarse ADN con tres reacciones químicas específicas para cada base, utilizando la ausencia de banda para identificar la posición de la cuarta base; sin

embargo, las aproximaciones tienden a error o a malinterpretarse por otra base, por esa razón se describen las reacciones para diferenciar que son redundantes.

El método de Maxam y Gilbert es óptimo para ADN que no puede secuenciarse de forma adecuada mediante otros métodos (por ejemplo, oligonucleótidos pequeños y secuencias de ADN que producen terminación prematura debida a estructuras secundarias fuertes). Además, la secuenciación de Maxam y Gilbert puede usarse para mapear modificaciones de ADN, como alquilaciones y roturas producidas por carcinógenos, antineoplásicos y otros agentes que tienen como blanco el ADN. En ensayos de huella digital química o enzimática, la técnica permite la identificación precisa de secuencias específicas de ADN que se unen a moléculas pequeñas y proteínas. Por ello, las mejoras al método son benéficas para gran variedad de aplicaciones en biología molecular y bioquímica.

El método "didesoxi" de Sanger

Sanger también desarrolló otro método, el cual emplea análogos de dNTP específicos de terminación de cadena. Los análogos más utilizados son los didesoxinucleótidos trifosfatados (ddNTP), iguales que los dNTP pero sin el grupo hidroxilo en el carbono 3' de la desoxirribosa. Estos pueden incorporarse a una cadena de ADN en crecimiento por medio de la ADN polimerasa, pero actúan como terminadores porque, una vez incorporados a la cadena, y al no contar con el OH en el extremo 3', no permiten que se una otro nucleótido. Este método es más rápido y acertado que el método químico de Maxam y Gilbert, por lo que es el utilizado en la actualidad de manera rutinaria en los laboratorios. El proceso consiste en encontrar diferentes cadenas, tantas como número de bases tenga el fragmento que son copias de la cadena de ADN que se va a secuenciar, cada uno de un tamaño diferente y terminado con la incorporación de un 2' 3' didesoxinucleótido (figura 17-3).

El principio del método "didesoxi" es el siguiente: se aísla y se clona el ADN que se desea secuenciar; este ADN se desnaturaliza y se emplea una sola hebra en la secuenciación. En la secuenciación se utiliza un iniciador o *primer* marcado radiactivamente, el cual usualmente es un fragmento de restricción, que suministra el extremo 3' OH que necesita la ADN polimerasa para continuar la adición de nucleótidos. El iniciador y el molde de ADN se alinean para formar un complejo iniciador-molde y la mezcla resultante se divide en cuatro partes. Con estas mezclas se preparan cuatro tubos de reacción, cada uno con el ADN molde de hebra sencilla que se desea secuenciar, la ADN polimerasa, el iniciador marcado radiactivamente y los cuatro dNTP. A cada tubo se le añade uno de los ddNTP en exceso, es decir, en mayor proporción respecto a su dNTP convencional (10:1). En cada uno de estos tubos se producirán cadenas de ADN de distintas longitudes, terminando todas en el lugar en el que se incorporó el "didesoxi" correspondiente (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) añadido al tubo.

Por ejemplo, una muestra de ADN se incuba con ADN polimerasa en presencia de una mezcla de ddTTP (didesoxitimidina fosfato) y con bajas concentraciones de TTP junto con concentraciones normales de los otros tres dNTP (uno de los cuales puede marcarse con ^{32}P, ^{35}S o con marcadores quimioluminiscentes o fluorocromos). Conforme la cadena de ADN se forma en el extremo 3' del iniciador, la posición de T se estará agregando en algunos casos con el sustrato normal y, por ende, la cadena seguirá extendiéndose. En ocasiones se agregará un ddTTP, lo que hará que acabe la síntesis, tal que al término de la incubación seguirá habiendo una mezcla de cadenas de longitud variable con terminación T en su extremo 3', pero todas con el mismo extremo 5' (el extremo 5' original del iniciador). Incubaciones similares se llevan a cabo en presencia de cada uno de los otros 3 ddNTP, lo que da mezclas de terminación en la posición de cada uno de los nucleótidos restantes C, A o G, respectivamente.

Las cuatro mezclas son separadas en paralelo (cada mezcla de reacción en un carril) por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida-urea en condiciones desnaturalizantes (acrilamida 12% con urea 8 M), con resolución de un solo nucleótido. Este sistema separa las cadenas de ADN de acuerdo con su longitud; así, las más pequeñas migrarán más rápido y las más grandes, más lento.

En teoría, cada una de las fracciones de las mezclas tendrá suficientes fragmentos terminados en cada una de las posiciones del nucleótido y podrán visualizarse mediante autorradiografía cuando se utiliza marcaje radiactivo, ya sea en el iniciador o en alguno de los dNTP. El tiempo de exposición de la placa de rayos X sobre el gel varía de 20 a 30 horas y se expone a temperatura ambiente. En la actualidad, se emplean marcas quimioluminiscentes (fluorescentes) para evitar el manejo de radiactividad. En este caso el marcaje es con fluorocromos en el extremo 5' del iniciador y la identificación se hace separando los diferentes fragmentos por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida, para que, de esta manera, la secuencia pueda leerse directamente sobre el gel, de acuerdo con el patrón de bandas.

En general, secuencias de entre 15 a 200 nucleótidos desde el sitio del iniciador pueden determinarse con precisión mediante un solo iniciador e inclusive es posible leer hasta 300 nucleótidos. El problema más grave es el apilamiento de bandas, causado por las asas de apareamiento de bases que se forman en el ADN en las condiciones de la electroforesis del gel de acrilamida y que se observan como un número de bandas en la misma posición o inusualmente muy cercanas unas a otras en la electroforesis.

Método automatizado

Uno de los mayores avances en la tecnología de secuenciación del ADN fue el desarrollo de la secuenciación automatizada, ya que aunque los procedimientos propuestos tanto por Sanger como por Maxam y Gilbert son relativamente sencillos y su interpretación es fácil, su capacidad de resolución de los procedimientos utilizados es limitada.

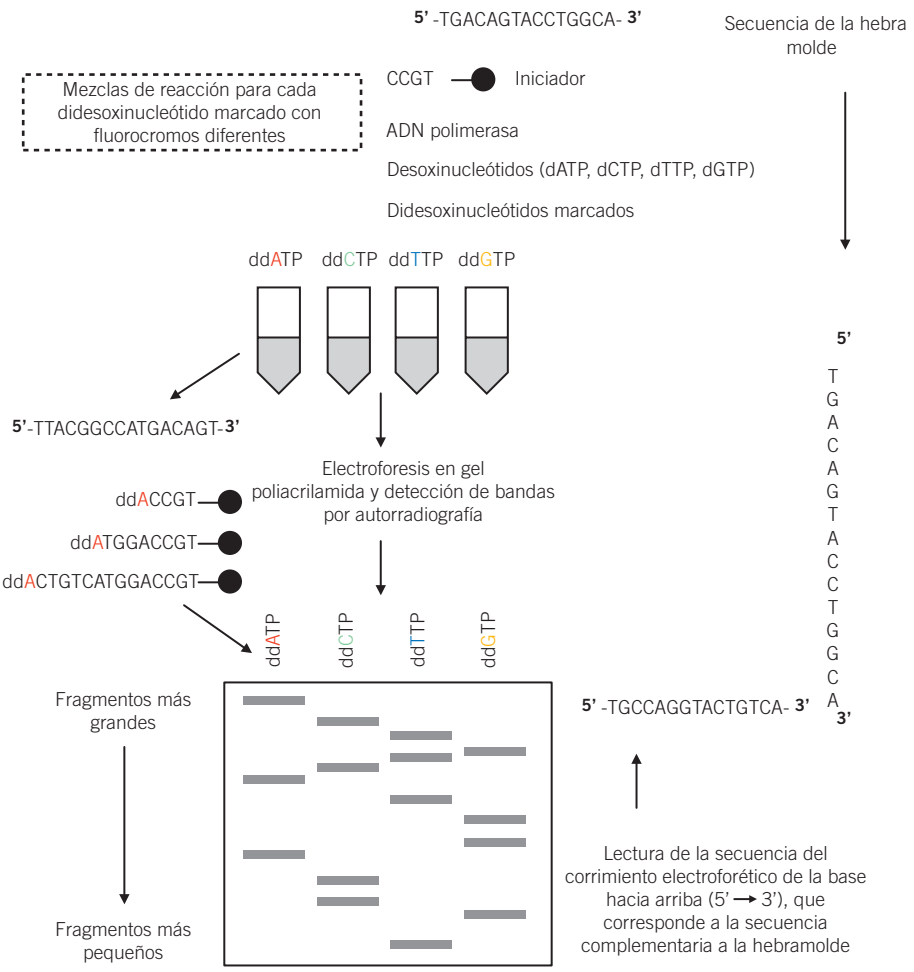


Figura 17-3. Método de secuenciación "didesoxi" de Sanger. La reacción requiere la hebra molde de ADN de cadena sencilla marcada radiactivamente, un iniciador, ADN polimerasa y cuatro dNTP. La reacción es dividida en cuatro alícuotas, uno para cada base, cada tubo contendrá uno solo de los ddNTP marcados y los otros tres dNTP y se continúa con la polimerización incorporando los nucleótidos en sentido 5' → 3'. Cuando se marcan con flurocromos la reacción total se puede hacer en un solo tubo, ya que el color emitido servirá para diferenciar las cadenas.

El método de Maxam y Gilbert fue muy popular en sus inicios; sin embargo, con la descripción del método enzimático didesoxi, o de terminación de cadena, esta técnica quedó en desuso, ya que involucra el uso de sustancias químicas peligrosas y cantidades elevadas de ADN marcado radiactivamente, además de ser técnicamente más complejo. Por ello, en la actualidad los procedimientos de secuenciación automatizada están basados en el método enzimático de Sanger, que suple el marcaje radiactivo con métodos quimioluminiscentes con el uso de fluorocromos. De esta manera, para la lectura de la secuencia se utilizan sistemas ópticos que detectan los diversos fluorocromos empleados, con lo que se logra un método más directo, fácil, rápido y seguro. Esta variante es conocida como *dye-primer sequencing* (secuenciación mediante colorantes acoplados al iniciador).

Para evitar el error debido a lo repetitivo y a los pasos de pipeteo, en la actualidad un robot industrial puede automatizar las reacciones de secuenciación del método didesoxi. Este sistema utiliza microrreacciones a temperatura controlada; en un ciclo de reacción (alrededor de 50 minutos) se procesan arriba de 48 moldes. Con este robot se resuelven más de 450 bases en secuenciación automática de ADN, protocolo que es aplicable tanto a marcaje radiactivo como fluorescente.

En estos sistemas automatizados el fragmento de ADN fluorescente pasa por el punto de tensión del secuenciador automático, y estas señales se envían a una computadora con un programa especial. Así, un golpe de láser excita la tinción fluorescente, la señal de fluorescencia emitida se digitaliza y es captada por detectores que una computadora analiza y descifra, y pueden observarse los resultados obtenidos en tiempo real. En minutos, este programa procesa la imagen del gel capilar. Para cada muestra secuenciada se crean curvas de cuatro colores, uno por cada nucleótido, y

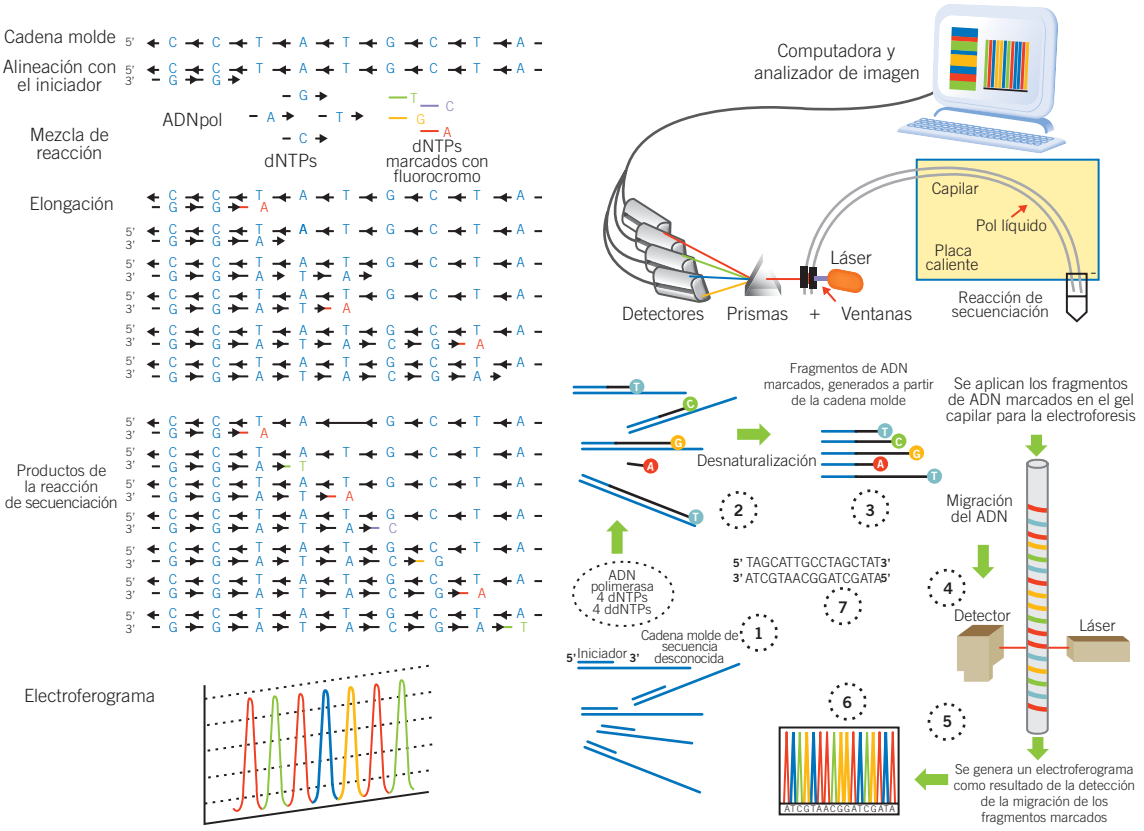


Figura 17-4. Método de secuenciación automatizado. Para realizarlo se obtienen fragmentos de ADN de la hebra molde de interés, se marcan los cuatro nucleótidos con fluorocromo de distinto color, se realiza el ciclo de secuenciación mediante PCR, se eliminan NTP sobrantes. Los fragmentos son sometidos a electroforesis en gel y mediante el sistema automatizado; el láser emitirá la luz que el detector interpreta diferencialmente de acuerdo con el fluorocromo que pase por el haz de luz para generar un patrón de curvas de acuerdo a la longitud de onda diferente para cada base, a fin de poder leer la secuencia obtenida.

debajo de cada pico de la secuencia se identifica la secuencia de nucleótidos correspondientes al fragmento analizado. Puede analizarse la secuencia de 10 muestras simultáneamente o bien estudiar 40 fragmentos de ADN.

La secuenciación por terminación fluorescente es un método para el análisis de la secuencia del ADN mediante automatización parcial. Es una variante modificada en la cual el marcaje se realiza con un fluoróforo unido de forma covalente en el oligonucleótido iniciador utilizado. En esta opción se utiliza un color diferente para cada fluoróforo de cada reacción específica para nucleótidos A, C, G o T, marcándolos como terminadores reversibles mediante la unión del fluoróforo a la base en el grupo 3'-OH, de tal forma que la ADN polimerasa aún la puede reconocer como sustrato. Después, las mezclas de reacción se combinan en una coelectroforesis en un mismo gel, y la información de la secuencia se lee directamente mediante una computadora. Cuando el fluoróforo se agrega en la terminación de la cadena, se tiene la ventaja de que este último método puede llevarse a cabo en una sola reacción en lugar de en cuatro, como en el método en que se marca el iniciador. En esta reacción los ddNTP se marcan con fluorocromos de diferente color para cada base, con lo cual la terminación de cada cadena determinará el color y, por ende, el NTP respectivo. Esto hará que al fluorescer a diferentes longitudes de onda, el sistema óptico del equipo identifique directamente en un gráfico las señales de fluorescencia de cada una de las bases (figura 17-4). El gráfico generado es acorde con el color del fluorocromo, en el cual se representa cada base con picos de intensidad de luz.

Las investigaciones siguen progresando de tal forma que se ha planteado la utilización de la tecnología de espectrofotometría de masas para secuenciar ADN. Otras propuestas adaptan la técnica de Maxam y Gilbert en una tecnología innovadora denominada *secuenciación multiplex*, que permite aumentar la velocidad de secuenciación y faculta al investigador para analizar un gran grupo de fragmentos de ADN como una mezcla a través de los pasos de secuenciación de ADN, lo cual incrementa la eficiencia de los procedimientos estándares por un factor de 10.

La pirosecuenciación es un sistema basado en el método enzimático, que aprovecha la liberación de pirofosfato cuando un nucleótido se incorpora en la hebra de ADN en crecimiento, mediante bioluminiscencia; es un sistema útil para

analizar tanto secuencias cortas de ADN como polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y genotipificación. La longitud de lectura tendrá que seguir mejorando para dar aplicaciones más precisas y más amplias a esta alternativa. Este método tiene la dificultad de que descifra de forma adecuada las regiones homopoliméricas del molde de ADN; sin embargo, existen abordajes metodológicos que permiten modificar nucleótidos en posición 3'-OH mediante enlaces químicos reversibles para terminación de cadena usando un grupo alil o un grupo 2-nitrobencilo.

Se han propuesto métodos de secuenciación del ADN que no involucran ni electroforesis en gel o reacciones químicas o enzimáticas. Entre ellos se encuentran métodos con fluorescencia para detección mediante citometría de flujo como alternativa a la técnica de secuenciación en geles, la posibilidad del marcaje de la ADN polimerasa o la secuenciación por nanoporos; otros enfoques están dirigidos a la utilización de microscopia electrónica de túnel para leer las bases directamente en la hebra de ADN mediante el marcaje de las bases con halógenos para la detección visual.

La dificultad para secuenciar fragmentos de ADN de longitudes grandes (> 300 nucleótidos) se debe a la capacidad limitada para resolver fragmentos grandes de ADN que difieran en un solo nucleótido. Una de las soluciones es la secuenciación sobrelapada, en la cual el ADN genómico se fragmenta y se clona en un vector de ADN, se amplifica, se purifica y se analiza para ensamblarse en una secuencia larga y continua, donde se identifican las regiones sobrelapadas (secuenciación *shotgun*, de fuerza bruta o de un tiro). Para llevar a cabo esta técnica no se requiere contar con antecedentes de la secuencia de ADN, por lo que se le conoce como secuenciación *de novo*.

Técnicas desarrolladas recientemente permiten secuenciar ADN genómico de células microbiales individuales (secuenciación de célula única). Ésta es una estrategia útil para determinar secuencias naturales de microorganismos que suelen cambiar cuando se cultivan en laboratorio. Además, las reacciones de amplificación pueden producir rearreglos en el ADN, de tal forma que, al no requerir ni el cultivo ni la reacción, se puede llevar a cabo la determinación de la secuencia de la célula original tomada directamente del ambiente. En la actualidad, en los centros de secuenciación más de 70% de los genomas se recuperan de célula única.

Secuenciación de alto rendimiento: la secuenciación de la próxima generación

A partir del Proyecto Genoma Humano, en 2008 se secuenció un genoma humano completo en cinco meses con 1.5 millones de dólares; en 2009 el proceso se realizó en horas y con sólo 10 000 dólares, y actualmente, con un menor tiempo y costo, en una sola reacción se puede conocer la secuencia completa de un individuo, lo cual demuestra la gran capacidad y la rapidez con que ha evolucionado la secuenciación, sobre todo en los últimos cinco años.

Las plataformas actuales comparten características tecnológicas comunes, como secuenciación masiva en paralelo de moléculas únicas de ADN separadas en un flujo de células o clonadas *in vitro*, para lograr muchas copias de la molécula original y después ser amplificadas, con ciclos repetidos de extensión de nucleótidos mediados por polimerasas o por ligación de oligonucleótidos. Como se trata de un proceso masivo en paralelo, estos sistemas pueden generar centenares de megabases (Mb) y gigabases (Gb) de secuencias nucleotídicas en un solo corrimiento de un aparato.

Por ejemplo, la tecnología 454 (Roche; http://www.454.com) se deriva de la pirosecuenciación y la PCR de emulsión, en la cual se detecta la quimioluminiscencia generada por la liberación de pirofosfatos cuando se incorpora un dNTP en una reacción de polimerización. Según estas bases, en 2005 se presentó el GS20 como el primer secuenciador de nueva generación, mediante el cual se pudo secuenciar el genoma de *Mycoplasma genitalia* (580 069 pb secuenciadas a 96% con 99.96% de precisión) en una sola corrida. Posteriormente, en 2007, Roche Applied Science adquirió la 454 Life Sciences y presentó una nueva versión, GS-FLX, el cual mediante el mismo principio permite hacer microtitulaciones (a nivel de picolitros, es decir, la millonésima parte de un mililitro) mediante un haz de fibra óptica.

El método para secuenciar con este tipo de tecnología requiere preparar una genoteca de ADN molde mediante fragmentación por nebulización o sonicación, los fragmentos se reparan en sus extremos y ligados a oligonucleótidos; después, la genoteca de ADN se diluye hasta la concentración de molécula única; luego se desnaturaliza e hibridada a una microesfera que contiene oligonucleótidos adaptadores con secuencias complementarias, con las cuales se lleva a cabo la PCR de emulsión; posteriormente, se liberan los fragmentos y se someten a enzimas de secuenciación mediante un flujo sucesivo de los 4 dNTP. Cada evento de incorporación de un dNTP produce la liberación de un pirofosfato, y el sistema reconoce la luminiscencia producida, que se transmite por la fibra óptica que dirige y traduce la señal. Una ventaja reconocida de la tecnología 454 es la amplia longitud de lectura de secuencias, ya que puede leer fragmentos de más de 400 bases de longitud mediante el principio de pirosecuenciación y en el tiempo de una sola corrida (10 horas) se pueden secuenciar 500 Mb.

Además, la secuenciación de la nueva era permite llevar a cabo la secuenciación de transcriptomas, un enfoque muy poderoso denominado *ARN-Sec*, para mapear y cuantificar tránscritos a partir de muestras biológicas. El rango dinámico del ARN-Sec para determinar niveles de expresión es de 3-4 órdenes de magnitud, comparado con dos órdenes de magnitud de expresión por microarreglos. De esta manera, esta alternativa permite la detección cuantitativa tanto de tránscritos producidos a bajo y alto nivel, además de poder

deducir la diversidad de la información cualitativa y cuantitativa del corte y empalme. La ARN-Sec se ha aplicado a gran variedad de organismos, incluidos *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, ratón y células humanas.

La secuencia de nucleótidos de los genes humanos ha sido y continúa siendo de gran importancia como herramienta de investigación para el entendimiento de las bases de los procesos celulares que definen la fisiología y el desarrollo. La organización de los genes en los genomas existe en un cromosoma concreto en un orden particular. La comparación de mapas cromosómicos de animales superiores proporciona información acerca de cuál organización génica está asociada con qué expresión génica y qué función génica. Sin embargo, conocer la secuencia de ADN de los genes y cómo se traducen en proteínas no es suficiente para establecer cómo están controlados o cómo la función del producto génico en una célula particular en el organismo es un todo. Entender la relación entre la estructura de la proteína y su función es el siguiente paso crucial.

Microarreglos

La bioinformática es el campo de la ciencia en la cual las tecnologías de la información, las ciencias de la computación y la biología se unen para formar una sola disciplina. Este campo ha sido indispensable para la interpretación de la secuenciación de los genomas, ya que por la cantidad de nucleótidos, el gran número de reacciones, el análisis del sobrelapamiento y la coordinación de las secuencias sólo pueden evaluarse de forma adecuada gracias a los programas y a las bases de datos que guardan toda la información que se produce día a día. Por ejemplo, el genoma humano consta de 3 mil millones de pares de bases, si la fragmentación del genoma se llevara a cabo cada 500 nucleótidos y éstos pudieran secuenciarse sin sobrelapamiento, sería necesaria la secuenciación de 6 millones de fragmentos.

El uso de la bioinformática desembocó en la implementación de una nueva herramienta de la biología molecular y la genómica denominada *microarreglos (microarrays)*.

Los microarreglos constituyen una distribución ordenada de más de 10 mil genes por cm^2 en una pequeña superficie, del tamaño de un portaobjetos, en el cual pueden estudiarse simultáneamente mediante hibridación y puede obtenerse una interpretación instantánea de la expresión de múltiples genes (distinguibles unos de otros) en un solo análisis.

Para ello, es necesario contar con un soporte o matriz sólida (membranas o vidrio) donde se inmovilicen las sondas de unos cuantos pares de bases de longitud, para su exposición a la muestra que se pretende analizar.

El fundamento de la técnica de microarreglos se basa en la hibridación de ácidos nucleicos y su detección por fluorescencia mediante análisis de imagen, de tal manera que, como en otras técnicas, sólo se obtendrá señal fluorescente en los puntos (genes) donde haya habido hibridación; la intensidad de fluorescencia será directamente proporcional al nivel de expresión del gen (figura 17-5).

Para poder interpretar los resultados debe existir previamente una cédula de identificación, es decir, una plantilla que defina la codificación que se esté manejando de acuerdo con la base de datos que se trabaje, a fin de saber en qué posición se ubica un determinado gen o marcador y cuál muestra fue aplicada. Para poder diferenciar los puntos que emiten fluorescencia y poder relacionarlos de forma correcta con el gen correspondiente, y así poder "leer" el resultado claramente, deberán determinarse diferencias significativas que muestren datos relevantes en el estudio. Por esto, el diseño de los microarreglos debe obedecer a un diseño de estudio bien planeado que responda a las incógnitas que plantea la investigación para los genes de interés. Para ello, debe contarse con una muestra de análisis de muy buena calidad, en que la pureza e integridad se aseguren para contar con resultados confiables y sin contaminación. Además, debe contarse con un buen método bioestadístico para inferir resultados.

A fin de estandarizar la metodología se ha propuesto trabajar con duplicados, de diferentes fuentes o eventos —duplicado biológico— o mediante dos ensayos diferentes de una misma muestra para verificar la calidad y reproducibilidad de los resultados —duplicado técnico—. Para ello se ha sugerido el uso de moléculas de ARNm que funcionen como controles internos, ya que esta técnica permite detectar incluso un solo tránscrito, lo que da confiabilidad al ensayo.

El tipo de ensayo de microarreglos dependerá de la sonda utilizada. Entre los más comunes se encuentran los empleados para determinar cambios en los niveles de expresión de genes o análisis de mutaciones o polimorfismos. En el caso de las sondas, los oligonucleótidos son ADN sintético de cadena sencilla (15 a 25 o 50 a 120 nucleótidos). En la actualidad, la tendencia es utilizar oligonucleótidos de longitud corta. En esta presentación existen los bioarreglos *(bioarrays)*, con genes preseleccionados para diagnóstico de enfermedades precisas. Su aplicación está enfocada al desarrollo de fármacos y terapias, respuesta a medicamentos y asesoramiento de riesgos de enfermedades o progresión.

Además, existe la alternativa del ensayo de microarreglos de proteínas, donde las sondas son anticuerpos fijos en el soporte; sin embargo, aún no se ha estandarizado por completo, debido a la complejidad de estructuras tridimensionales en estas moléculas. Por otro lado, los microarreglos en tejidos son una buena alternativa cuando se cuenta con cantidades limitadas de muestra para realizar pruebas de ADN, ARN o proteínas.

Adicionalmente, se integra un método citogenético molecular llamado *hibridación genómica comparativa* (*comparative genomic hybridization*, CGH), basado en la hibridación competitiva por coloración diferencial entre el tejido con la anomalía y sin ella, a partir del análisis de metafases o de ADN genómico. Para este tipo de análisis se utilizan gran-

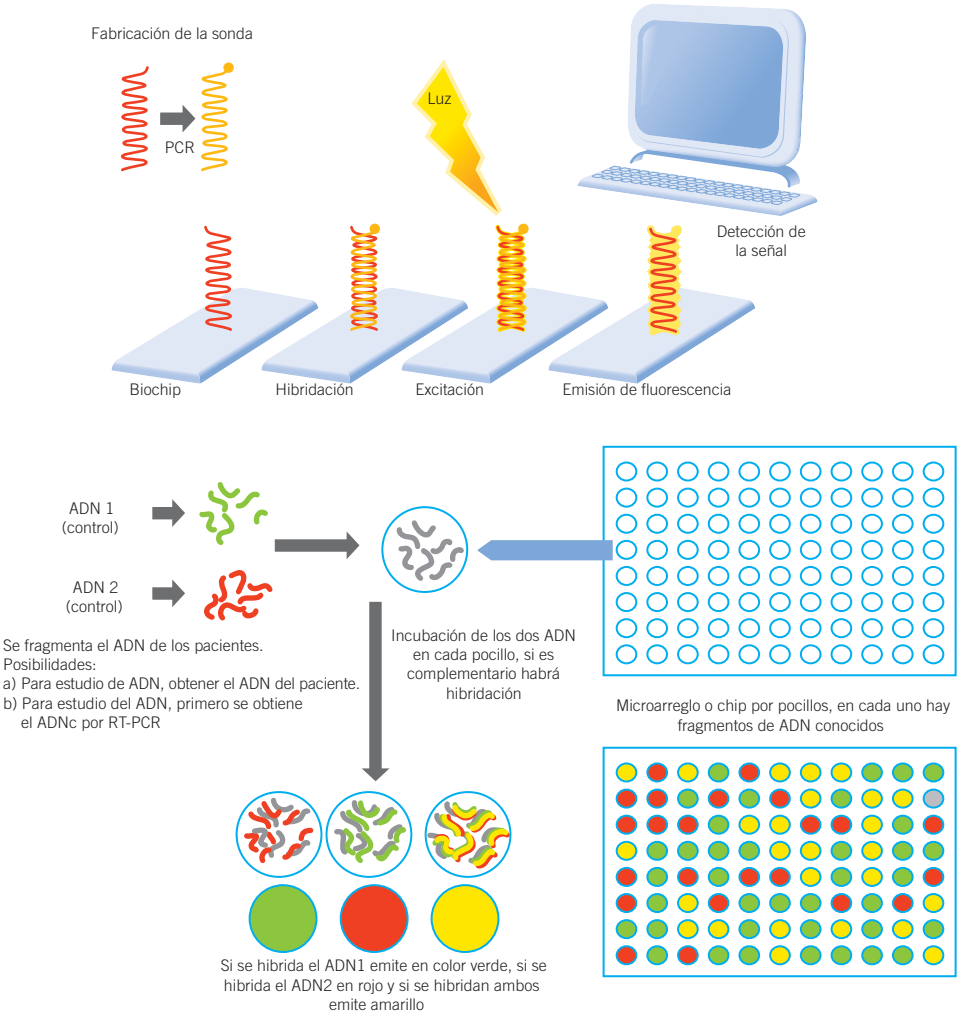


Figura 17-5. Microarreglos. Un microarreglo es una distribución ordenada de genes en una pequeña superficie, y mediante hibridación con el ADN problema se puede obtener respuesta instantánea de la actividad o expresión de múltiples genes en un solo análisis. La intensidad de fluorescencia es directamente proporcional al nivel de expresión del gen. La interpretación de los marcajes indicará un patrón de colores; así, cada punto en el soporte del microarreglo se asocia con el gen localizado según su color.

des porciones de ADN genómico en las que se incluyen regiones conocidas de cromosomas, a fin de estudiar anomalías cromosómicas, como ganancias y pérdidas de genes relacionados con una enfermedad particular (por ejemplo, para la detección de tumores, defectos congénitos, presencia o ausencia de genes predisponentes o número de copias de genes involucrados en la evolución de la enfermedad). Este método presenta la ventaja de poder analizar muestras de archivo, incluso embebidas en parafina. En el ensayo se utilizan sondas con regiones cromosómicas específicas y se hibrida con ADN genómico marcado de los tejidos enfermo y sano. De esta manera, la fluorescencia emitida se diferenciará de acuerdo con la presencia del gen o el número de copias, comparado con el tejido sano o control; así, la aplicación del ensayo es útil para la clasificación de tumores, el asesoramiento de riesgos, la predicción de la evolución clínica, así como para determinar qué tratamientos farmacológicos son adecuados y su efectividad.

Los elementos que hay que tomar en cuenta para un buen ensayo de microarreglos deben contemplar el diseño experimental, el diseño del arreglo que se utilizará y la localización de cada punto en el arreglo, las muestras utilizadas y su marcaje, así como los controles, la hibridación, los datos generados y su análisis e interpretación. El proceso implica preparar el soporte con los ADN elegidos, incubar e hibridar con el ADNc y las marcas fluorescentes, detectar la unión de ADNc mediante tecnología láser, almacenar los datos y analizar las imágenes con métodos estadísticos adecuados. La interpretación de los marcajes indicará un patrón de colores, en el que de manera general un color "A" representaría al ADN control, uno "B" al ADN de la muestra de análisis, uno "C" indicaría una doble hibridación y el negro, o sin color, la no hibridación. De esta manera, cada punto en el soporte del microarreglo se asocia, según su color, con el gen localizado. Según el tipo de arreglo, la localización, así como la intensidad de color, se obtendrá infor-

mación acerca del estado del gen y de su nivel de expresión (ver la figura 17-5).

La tecnología de microarreglos surgió hace poco más de una década y fue recibida con entusiasmo, ya que permitía conocer la expresión de gran número de genes al mismo tiempo. Esta tecnología revolucionó el área por su aplicación en el entendimiento de las enfermedades complejas y de la medicina personalizada. En la actualidad, su uso se ha diseminado a campos de la biología básica, estudio del cáncer, diagnósticos de enfermedades, guías de tratamiento e investigación de nuevos fármacos. Sin embargo, ahora es claro que la gran cantidad de información que se genera con esta tecnología se vuelve un problema más que una ayuda, ya que la interpretación de datos es complicada incluso para los estadísticos, por la gran cantidad de información obtenida, y aún no hay un consenso definitivo sobre cómo analizar e interpretar esta información. De hecho, los estudios con microarreglos aún están en desarrollo, por lo que se prevé que poco a poco se estandaricen procesos. Así, los nuevos enfoques estarán destinados a estudiar las familias génicas, el nivel de coordinación de su expresión entre familias y a conocer nuevos genes. De esta manera, la integración de la información acerca de los patrones de expresión génica múltiple y simultánea, la interacción y la coordinación de la función celular permitirán revelar cómo los múltiples productos génicos trabajan en conjunto para producir la gran gama de manifestaciones físicas y químicas que las células requieren. Mientras más se perfeccione esta tecnología, más precisa, confiable y útil será la información, a fin de prevenir o pronosticar enfermedades o su evolución, e integrar el diagnóstico y la terapia con fármacos o tratamientos personalizados. Incluso puede tener aplicación en la búsqueda de formas de vida en ambientes extremos o externos a nuestro planeta.

Ejercicios de integración

1. ¿Cuál es la secuencia de la hebra complementaria a esta secuencia de ADN?
   5'-AGCGTCATGTTATAGCTATCGGTCTAGCTCTGCAATCGAGCTCG-3'
   a) 5'-TCGCAGTACAATATCGATAGCCAGATCGAGACGTTAGCTCGAGC-3'
   b) 3'-TCGCAGTACAATATCGATAGCCAGATCGAGACGTTAGCTCGAGC-5'
   c) 5'-AGCGTCATGTTATAGCTATCGGTCTAGCTCTGCAATCGAGCTCG-3'
   d) 3'-TCGCATAGCCAAGACGTTAGGTACAATATCGACTCGGATCGAGC-5'
2. La secuenciación química tiene ventajas específicas sobre otras técnicas, señale cuál de las siguientes afirmaciones no es cierta:
   a) Los tratamientos químicos son sencillos de controlar, sólo una base es eliminada por hebra, lo que produce que los materiales marcados a través de la secuencia se distribuyan de forma correcta.
   b) Cada base es atacada, tal que cada base individual será desplegada en un corrimiento electroforético.
   c) Es un método óptimo para ADN que no puede ser secuenciado de forma adecuada mediante otros métodos, por ejemplo oligonucleótidos pequeños y secuencias de ADN que producen una terminación prematura debida a estructuras secundarias fuertes.
   d) La interpretación de los marcajes indica un patrón de colores, en el cual el verde representa el ADN control, el rojo el ADN de la muestra de análisis, el amarillo una doble hibridación y el negro la no hibridación.
3. En el método de secuenciación química, cuando se producen los fragmentos y se determina en el carril del gel la posición de una guanina, eso significa que el punto de terminación del fragmento secuenciado era:
   a) Guanina, porque es la base que se está detectando.
   b) Citosina, porque es la base complementaria a la cadena molde.
   c) Es la base previa a una guanina, porque por la reacción específica la G fue modificada y eliminada.
   d) Es la base previa a una adenina, porque la reacción es específica para purinas.
4. En el método de secuenciación de Sanger, el punto de paro de la síntesis se da como resultado de:
   a) La incorporación de una base modificada por reactivos específicos.
   b) La eliminación de un análogo de base marcado con un fluorocromo que emite en una longitud de onda específica.
   c) La incorporación de un didesoxinucleótido en la hebra que se está sintetizando.
   d) La incorporación de un desoxinucleótido análogo en la hebra que se está sintetizando.
5. Respecto al método de secuenciación automatizado, señale cuál de las siguientes afirmaciones no es cierta:
   a) Para llevar a cabo el proceso, como requerimientos básicos se debe contar con el marcaje diferencial fluorescente de los dNTP, sistema de electroforesis, láser, detectores de fluorescencia, computadora, analizador de imágenes.
   b) Se han desarrollado alternativas que permiten analizar un gran grupo de fragmentos de ADN como una mezcla, otros que no involucran ni electroforesis en gel o reacciones químicas o enzimáticas, como la citometría de flujo o microscopia electrónica de túnel para leer las bases directamente en la hebra de ADN.
   c) Según la sonda utilizada para la hibridación se determinan cambios en los niveles de expresión de múltiples genes a la vez, mediante el uso de ADNc o de oligonucleótidos, los cuales se amplifican selectivamente en placas por PCR y una vez verificada la calidad y pureza, se colocan en portaobjetos de vidrio por capilaridad.
   d) La técnica permite secuenciar ADN genómico de células microbiales individuales, estrategia útil para determi-

nar mutaciones en la secuencia de microorganismos que suelen cambiar cuando se cultivan en laboratorio.

6. ¿Cuál es la base de la técnica de microarreglos?
   a) Se basa en la polimerización de una hebra molde de ADN mediante bases modificadas, y la obtención de diferentes cadenas, tantas como número de bases tenga el fragmento, cada uno de un tamaño diferente y terminado con la incorporación de un didesoxinucleótido.
   b) Se basa en la hibridación de ácidos nucleicos y su detección por fluorescencia mediante análisis de imagen, de tal manera que sólo se obtendrá señal fluorescente en los puntos (genes) donde haya habido hibridación; la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional al nivel de expresión del gen.
   c) Se basa en la fragmentación específica del ADN, proceso que implica la modificación de una base, eliminación de la base modificada, rotura de la cadena de ADN en la desoxirribosa modificada y el análisis de la fragmentación por electroforesis en gel de poliacrilamida.
   d) Se basa en la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica.

Bibliografía

Chandra H., Reddy P.J., Srivastava S. Protein microarrays and novel detection platforms. *Expert Rev Proteomics,* 2011;8(1):61–79.

Gabrielson E., Berg K., Anbazhagan R. Functional genomics, gene arrays, and the future of pathology. *Mod Pathol,* 2001;14(12):1294–1299.

Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J, *et al.* (International Human Genome Sequencing Consortium) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature,* 2001;409(6822):860–921.

Maxam A.M., Gilbert W. A new method for sequencing ADN. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1977;74(2):560–564.

Mukherjee S., Tamayo P., Rogers S., Rifkin R., Engle A., Campbell C., *et al.* Estimating dataset size requirements for classifying ADN microarray data. *J Comput Biol,* 2003;10(2):119–142.

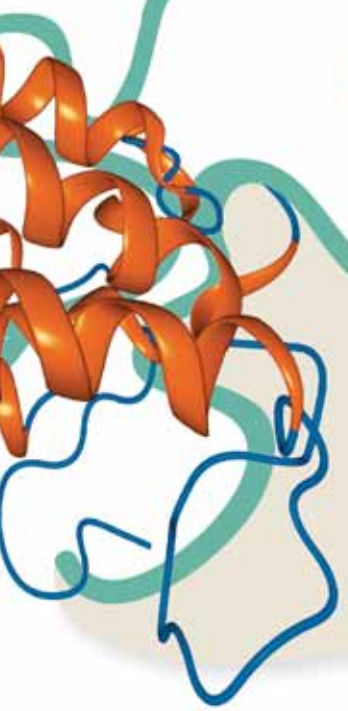
Sanger F., Nicklen S.,Coulson A.R. ADN sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1977;74(12):5463–5467.

Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P.,Dodd C., Connell CR, *et al.* Fluorescence detection in automated ADN sequence analysis. *Nature,* 1986;321(6071):674–679.

Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., *et al.* The sequence of the human genome. *Science,* 2001;291(5507):1304-1351. Fe de errores en: *Science,* 2001;292(5523):1838.

Voelkerding K.V., Dames S.A., Durtschi J.D. Next-Generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem,* 2009;55(4):641–658.

Zimmermann J., Voss H., Schwager C., Stegemann J., Ansorge W. Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett,* 1988;233(2):432–436.



Capítulo 18

Polimorfismos de ADN y huella genética

Belinda Claudia Gómez Meda / Ana Lourdes Zamora Pérez
María Guadalupe Sánchez Parada

Introducción

El ADN de todas las especies de organismos conocidas tiene la misma estructura química; sin embargo, cada organismo es completamente diferente a otro; la diferencia se debe al orden de las bases nitrogenadas en la molécula de ADN. Los organismos de una misma especie comparten secuencias en su molécula de ADN, pero aún dentro de la misma especie existen variaciones entre individuos. Organismos de una misma especie compartirán regiones de su secuencia hasta en más de 99%, lo que les confiere características similares; más aún, los familiares cercanos tendrán secuencias con mayor parecido entre ellos, pero nunca serán iguales, lo que define la variabilidad genética intra e interespecies.

En el caso del ADN humano, las secuencias que contienen a los genes son poco variables dentro de la especie; no obstante, el resto de la secuencia es muy propenso a la variabilidad y, debido a que hay millones de pares de bases por molécula de ADN y un alto porcentaje de ésta no codifica para una proteína, cada persona tiene una secuencia de ADN única, lo que permite identificarlo tan sólo por el orden de sus pares de bases. Estas secuencias variables se denominan *polimorfismos*.

Existen dos tipos de polimorfismos genéticos: los que muestran cambio de un solo nucleótido por sustitución de bases y los que implican cambios en el tamaño de la secuencia; esto puede deberse a inserciones o deleciones de secuencias de ADN, o bien a la repetición de bases (o combinación de bases) de manera continua en un segmento del ADN.

Esta variabilidad es un proceso biológico común, ya que 30% de la secuencia de ADN es altamente repetitivo, lo que permite establecer patrones genéticos específicos para identificar individuos, es decir, para establecer una huella genética o huella de ADN (*ADN fingerprinting*).

Por ello, los científicos han desarrollado estrategias para poder identificar individuos al analizar patrones repetitivos de ADN, los cuales no son un sello exacto, pero sí permiten relacionar muestras de un mismo origen o de personas emparentadas (familiares, ancestros comunes). Estas secuencias se eligieron porque se conoce que varían entre individuos no relacionados, de tal manera que el análisis de un grupo de ellas para encontrar concordancias permite inferir asociaciones con probabilidades altas de que tener un mismo origen o ser de la misma persona.

Un gen está representado como una sección de cromosoma, que equivale a un segmento de ADN con una secuencia determinada, con la información necesaria para crear una proteína específica. Los genes de un organismo contienen toda la información de manera precisa acerca de cada aspecto y proceso de la formación y desarrollo de un individuo; si bien, los genes no pueden dictar su comportamiento, por lo que hay que considerar que el ambiente desempeña un papel muy importante en cómo estos genes se expresan a lo largo de la vida del organismo.

Un gen se presenta en doble dosis, uno que aporta el padre y otro la madre; a estas copias se les llama alelos, por lo que hay dos alelos por cada gen, uno de origen materno y otro paterno. Estas formas alélicas de un mismo gen existen porque la secuencia del ADN está sometida a cambios, en ocasiones debido a mutaciones que suceden al azar pero que originan formas alternas de un gen, estables y heredables, a veces con una función diferente al alelo original o silvestre. La mutación es la base de la variación gradual de la estructura genética de las poblaciones; esto es, la base de la evolución.

La posición física donde se ubica un gen en el genoma se denomina *locus* (*loci* en plural), por tanto los alelos silvestres o modificados de un mismo gen residen en un mismo *locus*. Cuando un individuo tiene diferentes formas alélicas en el *locus* se dice que es heterocigoto, ya que la secuencia de cada alelo puede generar variantes de la misma proteína. Por el contrario, un homocigoto sería identifi-

cado cuando el individuo presente la misma forma alélica (de origen paterno y materno) en el *locus*, el resultado de la expresión génica será un mismo producto proteico, ya sea a partir del alelo silvestre o del modificado.

Polimorfismos

Las secuencias variables son múltiples en los organismos, los análisis de genética poblacional han permitido detectar dos o más alelos por cada una, y cuantos más alelos diferentes hay es más polimórfico; es decir, hay mayor poder de identificación, ya que como existe mayor variabilidad en las secuencias, será menos probable que dos individuos compartan las mismas regiones polimórficas.

Se considera que hay un polimorfismo genético cuando existen múltiples alelos de un gen en una población definida o, de manera más específica, cuando la secuencia de bases nitrogenadas de la molécula de ADN de un *locus* en particular es variable entre los organismos de una población.

La palabra polimorfismo está compuesta por *poli* (muchos), *morfo* (forma) e *ismo* (proceso o estado); es decir, "de muchas formas". Los ácidos nucleicos y las proteínas tienen la propiedad de presentarse en diferentes formas moleculares o en múltiples alelos, lo que puede tener implicaciones en las patologías moleculares. Un polimorfismo puede observarse en un individuo completo (polimorfismo fenotípico), en formas variables de proteínas o grupos sanguíneos (polimorfismo bioquímico), en las características morfológicas de los cromosomas (polimorfismo cromosómico) o en el ADN, por diferencias en la secuencia nucleotídica (polimorfismos del ADN).

Las variantes alélicas de las secuencias codificantes de genes en el ADN, debidas a procesos normales de la función celular, propician la producción de codones polimórficos y, con ello, de formas alternas de las proteínas, aunque generalmente sin que se altere la función del producto sintetizado, lo que permite diferenciar un polimorfismo de una mutación, lo que se da generalmente al azar.

El polimorfismo puede presentarse en la región promotora del gen, lo cual influye en la expresión génica del ARN mensajero y, por ello, en la proteína que codifica (diferentes fenotipos) o inclusive identificarse en regiones no traducidas (intrones), de tal forma que no se tiene una interpretación de su función, al menos conocida hasta ahora, pero siguen siendo secuencias que permiten diferenciar individuos y especies.

Los polimorfismos, como las mutaciones, pueden clasificarse, de acuerdo con su efecto, como polimorfismos sinónimos o silentes (los que no cambian la traducción del producto proteico en la variación de la secuencia; esto es, los que, cuando la secuencia nucleotídica cambia, el codón que codificaba al aminoácido original se cambia por otro que codifica para el mismo aminoácido o por otro con características químicas similares), y polimorfismos no sinónimos (los que sí producen variación en la lectura del código genético, por alterar codones que cambian el sentido de la traducción de un aminoácido por otro. Además, se considera que los polimorfismos neutros, que son los que varían en su secuencia en regiones no codificables del ADN también son silentes. Un polimorfismo se considera neutro si la presencia o ausencia del alelo no confiere ninguna ventaja o desventaja al individuo. Además, un polimorfismo puede representar ventajas evolutivas para una determinada población, como conferirle resistencia a condiciones medioambientales, de acuerdo con la zona geográfica en la que habita.

El término *polimórfico* es útil para definir genes o alelos, e incluso se observan secuencias que varían mucho, como en los alelos que definen los grupos sanguíneos y las moléculas de los antígenos leucocitarios humanos (HLA, *human leukocyte antigen*, que constituye el complejo mayor de histocompatibilidad), a los que se considera altamente polimórficos.

En genética, el concepto básico de polimorfismo menciona que cuando un alelo en un *locus* en la población presenta una frecuencia de más de 1% se denomina *polimórfico*. Este porcentaje indica que la presencia de estas variantes es común y no se da por azar, es decir, que el alelo menos común no puede mantener su frecuencia simplemente por mutación.

Los polimorfismos se acumulan en las poblaciones hasta que se tornan comunes entre las especies; entonces se denominan *divergencia genética*. Así, con el paso del tiempo, un polimorfismo podría llegar a presentarse en un alto porcentaje de una población e incluso ser tan común como un alelo silvestre. Por tanto, un alelo que originalmente pudo considerarse polimórfico puede llegar a ser el alelo más común en una población.

La combinación de secuencias en los alelos que se heredan es única para cada descendiente; así, el análisis de sus polimorfismos permite obtener un patrón o perfil definido único para cada organismo, semejante al código de barras de los productos de los supermercados. A esto se le denomina *huella genética individual*, por su semejanza a las huellas dactilares, también únicas y características de cada persona.

Los polimorfismos se utilizan como marcadores genéticos para identificar o relacionar a personas, ya que al ser heredables, generalmente sin cambios de padres a hijos, permiten establecer parentescos biológicos directos, ya que comparten los mismos marcadores.

Para poder llevar a cabo estos estudios de marcadores, en primer lugar hay que definir los tipos de polimorfismos genéticos, ya que pueden clasificarse de acuerdo con diferencias de estructura, forma de transmisión, distribución, estabilidad, tamaño. Dado a que los métodos de estudio e identificación de polimorfismos son diversos y cada opción tiene ventajas y desventajas, la utilización de varios tipos de polimorfismos que aporten diferente información sobre su herencia e individualidad permite obtener resultados más amplios y útiles para una interpretación adecuada.

Tipos de polimorfismos

Las características de las secuencias que permiten detectar sitios polimórficos son muy variables. Así, pueden diferenciarse dos tipos de polimorfismos: los que involucran cambios en un solo nucleótido y en los que intervienen deleciones o inserciones de pocos o muchos pares de bases.

De acuerdo con esta clasificación, los marcadores polimórficos más utilizados para realizar un perfil genético son:

- Polimorfismos de un solo nucleótido o nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*, SNP).
- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*restriction fragments length polymorphism*, RFLP).
- Número variable de repeticiones continuas o en tándem (*variable numbers of tandem repeats*, VNTR). De estos polimorfismos se diferencian dos tipos: minisatélites y microsatélites.
- Repeticiones cortas y continuas (*short tandem repeats*, STR).
- Polimorfismos del cromosoma Y.
- Marcadores mitocondriales.
- *Insertion-deletion* (*InDel*).

Polimorfismos de un solo nucleótido o nucleótido único

Como su nombre lo indica, los SNP son variaciones en un solo nucleótido o par de bases en una secuencia dada (figura 18-1). Estos polimorfismos pueden estar representados por la deleción, inserción o sustitución de una base nitrogenada en la secuencia nucleotídica normal. Este tipo de polimorfismo es muy frecuente, y se ha descrito que es posible encontrar un SNP en el ADN humano cada 1 000 a 3 000 pb, en secuencias codificantes de proteínas. Además, es posible que estén presentes de manera más cercana en el ADN no codificante, inclusive entre 500 a 1 000 pb en promedio.

Las ventajas de los SNP como biomarcadores son básicamente su amplia distribución a través de todo el genoma humano, su frecuencia y su estabilidad; además, debido a su alta frecuencia, muchas enfermedades genéticas están causadas por un SNP o se relacionan con la identificación de un SNP específico.

Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

Este tipo de polimorfismos se evidencian mediante el uso de enzimas de restricción, que cortarán determinadas secuencias de ADN. De este modo se generan fragmentos (de restricción), que pueden hibridar con sondas específicas para poder reconocerlos. Si un SNP afecta el sitio de restricción de una enzima, se evidenciará un polimorfismo de restricción o RFLP. Cuando el cambio de un nucleótido altera la secuencia diana para una determinada enzima de restricción puede detectarse el polimorfismo en función de la variación que éste genera en el patrón de restricción. En los casos en que el sitio de restricción se reconozca en ambas cadenas de ADN, se considerará un homocigoto, y al

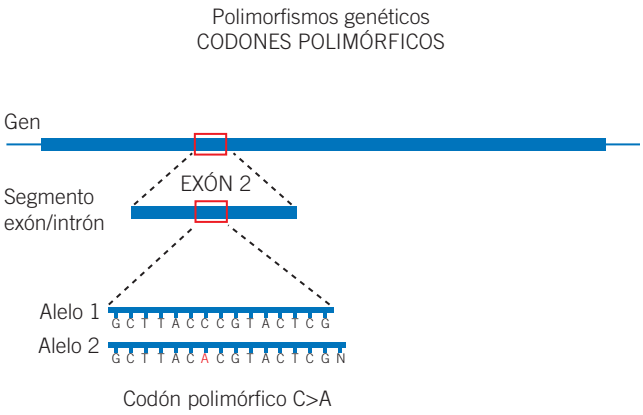


Figura 18-1. Polimorfismo SNP. Representado por el cambio de una base por otra.

resolver los fragmentos en un corrimiento electroforético se obtendrá como resultado una sola banda en el gel, a una distancia determinada (figura 18-2).

El hecho de que un individuo sea heterocigoto significa que tiene alelos diferentes en un determinado *locus*, por lo que al identificar su secuencia en un gel se observará más de una banda: una para el fragmento sin corte de restricción y otras con el corte. En este caso, el número de variantes alélicas es siempre dos (C: corta/NC: no corta) y se maneja en función de la identificación del sitio de restricción por la enzima utilizada en la digestión, es decir, si corta o no corta en la secuencia analizada. En cambio, pueden identificarse tres genotipos: homocigoto para corte C/C, heterocigoto C/NC y homocigoto para no corte NC/NC (figura 18-3). De esta manera se identifica a los individuos con reconoci-

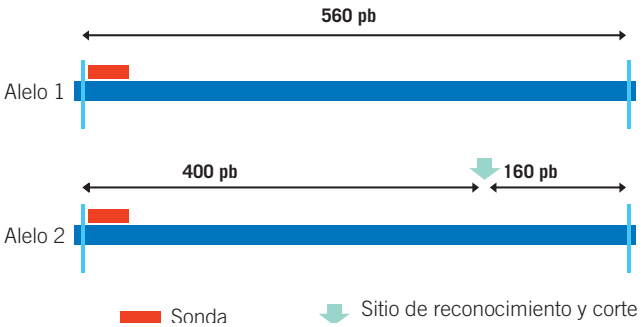


Figura 18-2. Polimorfismos genéticos RFLP. Sitio de reconocimiento de la enzima de restricción en un fragmento de ADN, mediante el cual se pueden evidenciar segmentos de diferente longitud de acuerdo con el fragmento de restricción generado. Resultado de la digestión. **Alelo 1.** Bandas variables (hay reconocimiento del sitio de restricción y hay corte enzimático; se evidencian dos fragmentos de 400 y 160 pb). **Alelo 2.** Banda única (no hay reconocimiento del sitio de restricción por la enzima, y por lo tanto no hay corte observando sólo una banda de 560 pb).

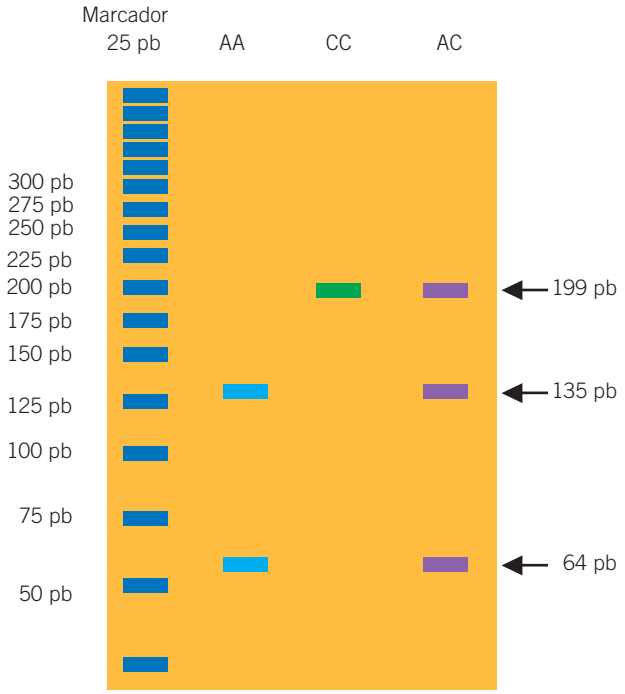


Figura 18-3. SNP TNFR1-383 A>C, identificado por PCR-RFLP. Fragmentos de digestión esperados para el polimorfismo TNFR1 -383 A>C. Se muestra el patrón de bandeo obtenido de un gel de electroforesis donde se evidencia la digestión con la enzima *Bgl* II para el polimorfismo TNFR1-383 A>C y se identifican diferentes genotipos: AA (135 y 64 pb), que identifica el homocigoto para corte de la enzima de restricción; AC (199, 135 y 64 pb), donde se observa un heterocigoto, el cual muestra una banda sin corte debido a que no hubo reconocimiento por la enzima, y otro par de bandas que muestran el corte enzimático por el reconocimiento del sitio de restricción, y CC (199 pb), que muestra al homocigoto sin corte, es decir, que no presenta el sitio de reconocimiento para el corte por la enzima, y por lo tanto, ambos alelos se evidencian con una sola banda.

miento de la enzima de restricción en ambos alelos, en uno solo o en ninguno de ellos (figura 18-3).

El hecho de poder diferenciar homocigotos de heterocigotos mediante este tipo de polimorfismos permite definir a los RFLP como codominantes; es decir, que ambos alelos se manifiestan sin dominar la expresión de uno sobre el otro. Sin embargo, a pesar de que los RFLP son prueba de que existe variación heredable en el ADN, este tipo de polimorfismos suele ser difícil de encontrar, y en todo caso, sólo permite determinar si se presenta o no un sitio polimórfico en una secuencia específica. Por ello, su utilización en el diagnóstico indirecto es limitada, ya que normalmente presentan un número de alelos bajo.

Satélites, microsatélites y minisatélites

El ADN satélite se define como secuencias repetitivas de tamaño variable, que pueden ir desde los 100 a los 200 nucleótidos repetidos en bloque uno tras otro (en tándem),

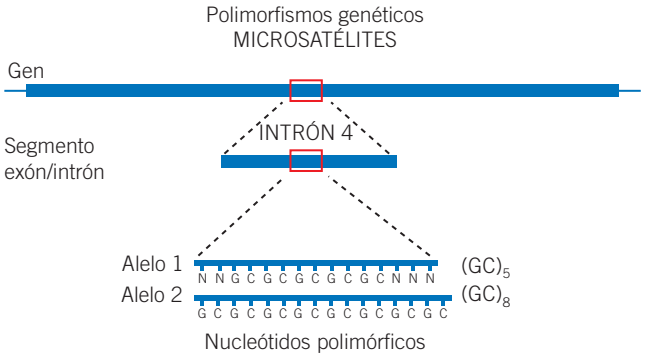


Figura 18-4. Detección de microsatélites. La detección de microsatélites se realiza en regiones no codificantes del ADN, en el cual se muestran alelos con diferencia en la repetición de nucleótidos de una secuencia analizada.

cientos o miles de veces a lo largo del genoma. Estas secuencias están localizadas en la heterocromatina constitutiva (por ejemplo, en los centrómeros o en regiones cercanas a los telómeros), aunque en ocasiones están presentes en algunas regiones intracromosómicas.

Asimismo, a lo largo de la secuencia de ADN es posible encontrar secuencias en las que se repiten de 2 a 9 pb, denominados *microsatélites*, o repeticiones de 10 a 60 pb, llamados *minisatélites*, que son más útiles para estudios de identificación que los satélites. Su identificación se lleva a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos que flanquean el sitio de la secuencia donde están localizados los mini o microsatélites, y su variación se identifica de acuerdo con el número de secuencias repetidas presentes, que puede ir desde dos repeticiones hasta cientos. Los mini o microsatélites se encuentran muy distribuidos a lo largo del genoma, aunque los minisatélites, en particular, se localizan con frecuencia cerca de la región telomérica. Se consideran polimorfismos codominantes, de tal forma que un heterocigoto generará dos bandas en un corrimiento electroforético, mientras que los homocigotos generarán sólo una banda con tamaño variable, de acuerdo con el número de repeticiones existentes en el individuo (figura 18-4).

Estas regiones de ADN repetidas en bloque o en tándem están sujetas a procesos como duplicación o recombinación, por lo que pueden ser altamente variables y diferir mucho entre individuos, lo que las convierte en marcadores genéticos muy informativos.

Polimorfismos con número variable de repeticiones continuas o en tándem, y con repeticiones cortas y continuas

Los VNTR y STR se consideran microsatélites o minisatélites, es decir, *loci* que corresponden a secuencias cortas de ADN (un par o trío de bases), repetidas en bloque o tándem un número específico de veces. La longitud de estas secuencias puede ser de pocas bases hasta algunas decenas de

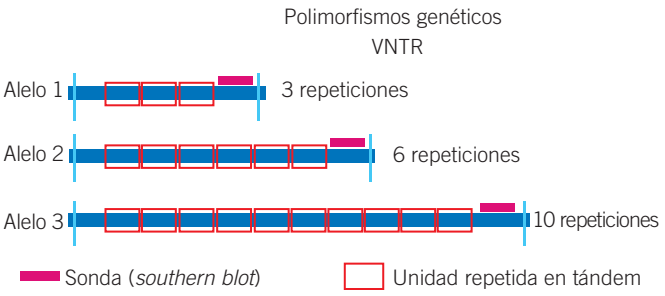


Figura 18-5. Análisis de VNTR. Se muestra el análisis de VNTR en alelos de diferentes individuos, en el cual se observa la variación en el número de secuencias repetidas en bloque o tándem, que será distintivo para cada individuo, de acuerdo con el marcador evaluado.

nucleótidos, y la cantidad de repeticiones determinará la variabilidad de alelos distintos en un mismo *locus*. Así, en un mismo cromosoma pueden existir regiones con diferente número de repeticiones en la población (figura 18-5).

Estos polimorfismos se localizan con frecuencia en regiones intrónicas o no codificantes, su longitud es variable, de entre 20 y 100 pb repetidas y su variabilidad es alta dentro de las poblaciones, lo que permite su uso confiable en la identificación de individuos.

Debido a que los polimorfismos son heredables, una persona podrá presentar VNTR heredados de su madre y padre, pero no podría presentar VNTR que sus padres no tengan. De esta manera, las secuencias repetidas de un individuo presentan un patrón único, y mientras más VNTR sean analizados más distintivo e individualizado será el perfil o patrón polimórfico obtenido, tal como las huellas dactilares, sólo que a escala molecular (figura 18-6).

El análisis con STR se basa en los microsatélites y se diferencian en motivos repetidos, denominados perfectos cuando se presentan sin interrupción y de forma ordenada (por ejemplo, TATATATATATATA); en caso contrario, se trata de repeticiones interrumpidas (TATATAGCTATAT) o combinadas (TATATAGCGCGCGCTATATA).

La desventaja principal de este tipo de polimorfismos es que no están distribuidos por todo el genoma, lo que limita su uso para determinadas condiciones o enfermedades; sin embargo, su aplicación ha sido amplia en pruebas de paternidad y en genética forense.

Polimorfismos del cromosoma Y

El cromosoma Y tiene recombinación genética con su homólogo (cromosoma X) sólo en aproximadamente 1% de su secuencia; por ello, la porción no recombinante es de especial interés, ya que contiene secuencias que no se encuentran en otras regiones del ADN nuclear, además de que son puramente de herencia paterna a hijos varones.

Si el interés es determinar relaciones familiares de herencia paterna, comparar familiares o descendientes varones, los

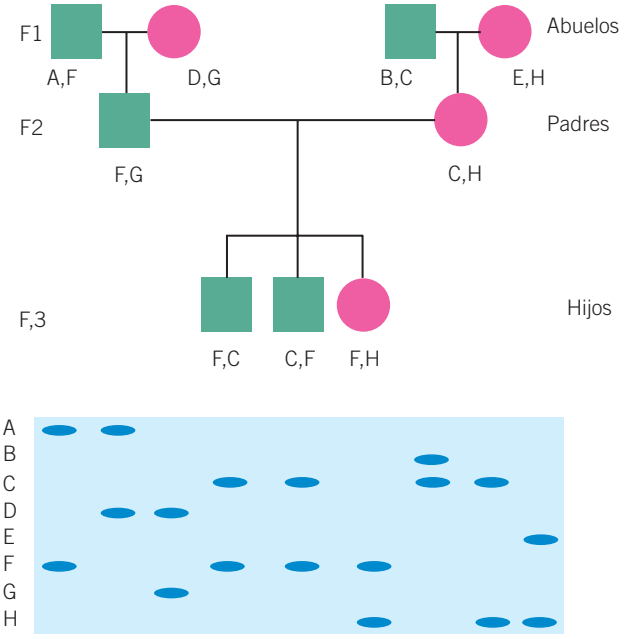


Figura 18-6. Identificación de parentesco. De acuerdo con el patrón de bandeo de un análisis de marcadores heredados de padres a hijos se realiza la identificación del parentesco.

polimorfismos de utilidad serían secuencias específicas del cromosoma Y, las cuales se identifican mediante amplificación de regiones determinadas, utilizando iniciadores específicos.

La secuencia de la heterocromatina del cromosoma Y es variable y a lo largo de la molécula se han identificado secuencias repetitivas tipo microsatélites, como repeticiones AC. Además, hay que considerar que el índice de mutación para el cromosoma Y es muy bajo y no tiene implicaciones negativas para la reproducción, de manera que son variaciones muy útiles para identificar parentescos o rastrear descendientes por línea paterna. Esto también ha servido, en los estudios evolutivos de la especie humana, para la determinación de un origen común, producto de una sola migración procedente de África.

Marcadores polimórficos mitocondriales

La mitocondria es un organelo celular que existe en múltiples copias según el tipo de célula. Las mitocondrias son exclusivamente de herencia materna, es decir, todos los descendientes tendrán en sus células mitocondrias de su madre. Esto se debe a que en el momento de la fecundación el óvulo conserva las mitocondrias en el citoplasma, mientras que las mitocondrias de espermatozoide, que se encuentran en el cuello, entre la cabeza y la cola, se eliminan y no se integran al interior del óvulo para la formación del embrión. Este método permite identificar a individuos de acuerdo con parentescos por línea materna, ya que todos los hermanos, hombres y mujeres, compartirán la misma información en su ADN mitocondrial (ADNm).Las ventajas del análisis del

ADNm es que existen múltiples mitocondrias (1×10^3-1×10^4 copias) por célula, cada una con varias moléculas de ADNm, caracterizado por ser una doble hebra circular y tener un genoma pequeño (16 569 pb, que codifica para 37 genes). Además, este genoma presenta una alta tasa de mutación (5 a 10 veces más que el ADN nuclear), lo que le confiere hipervariabilidad. Este tipo de análisis es útil, sobre todo para análisis evolutivos, antropológicos o forenses, o cuando no se tiene fácil acceso al ADN nuclear, éste está deteriorado o existe en ínfimas cantidades.

Para llevar a cabo este tipo de análisis, es necesario extraer el ADNm. Para ello, se requiere amplificar regiones determinadas del ADNm, en particular las regiones hipervariables HV1 (16024-16035, 342 pb) y HV2 (73-340, 267 pb), localizadas en la región control, que es la zona que regula la transcripción de la molécula. Estos segmentos de ADNm son luego secuenciados y comparados con muestras de familiares provenientes por línea materna, por el tipo de herencia mitocondrial, para detectar diferencias en la secuencia génica.

Insertion-deletion

Se han descrito polimorfismos que consisten en bases insertadas o suprimidas. Las secuencias involucradas son pequeñas, en general de hasta 10 pb; sin embargo, es posible que se presenten secuencias de hasta 1 000 a 1 500 pb, como en el caso de la inserción de elementos transponibles o transposones (fenómeno de transposición, presente en algunos genes que pueden moverse a través del genoma y reinsertarse en lugares definidos en otra región cromosómica).

Polimorfismos de secuencias aleatorias

Es posible analizar polimorfismos de fragmentos o secuencias de ADN amplificado de forma aleatoria (*Random Amplified Polymorphic ADN*, RAPD). La ventaja de esta técnica es que no se requiere conocimiento previo de la secuencia ni sondas homólogas, como en los RFLP, lo que la convierte en una opción como prueba tamiz.

En este caso, para la amplificación se utilizan iniciadores de 8 a 10 pb con secuencia aleatoria, de manera que, de encontrarse las secuencias de complementariedad entre el iniciador y la muestra de estudio, puede amplificarse una muestra representativa del genoma.

Al realizar análisis por electroforesis se evidenciarán múltiples bandas que muestran fragmentos de ADN; es decir, si existiera homología en las secuencias éstas serían amplificadas y evidenciadas como una sola banda, mientras que si no existiera homología entre el iniciador y la muestra, debido a algún cambio en la secuencia que hiciera perder la región de acoplamiento del iniciador, entonces el fragmento no amplificaría y no habría banda. Con este método no es posible diferenciar heterocigotos de homocigotos que presenten la secuencia, ya que en ambos se presentaría la banda en el gel, por eso se dice que es una prueba tamiz, ya que sólo identifica si se encuentra la secuencia en la muestra, pero no si esta secuencia se presenta en múltiples alelos o sólo en uno.

Polimorfismos de proteínas

Pueden realizarse estudios de polimorfismos de proteínas, mediante la identificación de la secuencia de aminoácidos. Esto es especialmente útil para la diferenciación de isoenzimas en el citoplasma celular, mediante la detección de mutaciones no sinónimas en el ADN, que ocasionarían que la estructura primaria de la proteína tuviera variaciones, aunque sin alterar su acción sobre un mismo sustrato, sino que sólo afectaría su afinidad por el mismo.

Este análisis se lleva a cabo mediante electroforesis, basado en que, al cambiar en la secuencia un aminoácido por otro con propiedades fisicoquímicas diferentes (por ejemplo, un aminoácido por uno básico, o uno polar por uno no polar), la estructura final de la proteína sería diferente y sus patrones de migración en la electroforesis se verían afectadas, ya que las cargas e interacciones entre aminoácidos tendrían variaciones. Estas variantes se consideran polimorfismos codominantes, ya que pueden tener función proteica a la par de su homólogo silvestre.

Este análisis es útil para identificar polimorfismos en proteínas que tienen función enzimática. Las variantes pueden dar diferente respuesta metabólica y ocasionar que la homeostasis se altere. Hay que considerar, sin embargo, la influencia ambiental, ya que si ésta es mínima es más sencillo analizar las consecuencias de un polimorfismo en la actividad de la enzima. Como ejemplo cabe mencionar las enzimas metabólicas de la familia citocromo P-450 (CYP450), que intervienen en la transformación, neutralización y eliminación de compuestos, por ejemplo, de los medicamentos.

Utilidad del análisis de patrones polimórficos o huella genética de ADN

Los métodos de estudio, cada vez más precisos, permiten llevar a cabo los análisis de marcadores genéticos casi con certeza absoluta. Sin embargo, el estudio de polimorfismos requiere de conocimientos técnicos y científicos adecuados, además de una gran experiencia en la interpretación de los resultados, a fin de que éstos sean confiables.

La creación de perfiles genéticos por medio de polimorfismos se realiza con marcadores o regiones con patrones de repetición definidas (micro o minisatélites). El perfil genético, o huella de ADN, determinará el genotipo de un individuo de acuerdo con los marcadores genéticos analizados. Cuanto mayor sea el número de marcadores analizados, mayor será la certeza para la identificación del individuo o para la confirmación de la relación filial, lo que permite realizar estudios de paternidad, filogenéticos, o de genética forense o criminalística, para la identificación molecular de individuos.

Los polimorfismos pueden asociarse directa o indirectamente a patologías o procesos de enfermedad específicos,

o incluso servir para establecer asociaciones entre la presencia del polimorfismo con un gen defectuoso cercano a él, por estudios de desequilibrio de ligamiento o solamente como marcadores de susceptibilidad, en los que su identificación permite establecer riesgos para el desarrollo de enfermedades multifactoriales.

Los polimorfismos conocidos y más útiles son generalmente modificaciones puntuales de la secuencia de ADN. Estas modificaciones se estudian principalmente para estudios de riesgo genético para diversas enfermedades, aunque también se consideran las variaciones de secuencia de fragmentos de cromosomas, como las alteraciones cromosómicas estudiadas en el cariotipo, los segmentos polimórficos en la heterocromatina del cromosoma Y, o las secuencias repetitivas, inserciones o deleciones, entre otras. Estas últimas, si bien también sirven para el diagnóstico genético, son más útiles para estudios de identificación familiar, filiación, identificación de individuos en accidentes, criminalística y ciencia forense, entre otros.

La identificación de SNP tiene una gran importancia en la investigación biomédica, ya que ha permitido conocer y entender el proceso de enfermedad, así como poder establecer estrategias de tratamiento, control y prevención.

Su aplicación clínica incluye, por ejemplo, la identificación de genotipo E4 del gen de apolipoproteína E humano (APOE), que se ha asociado con enfermedades del metabolismo de lípidos y con susceptibilidad a desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

En el gen del metil-tetrahidrofolato reductasa (MTHRF), involucrado en el metabolismo de folatos, se reconoce como distintivo el polimorfismo Cis677Tre, que genera una enzima termolábil menos activa. Esto produce niveles bajos de folato en plasma y niveles elevados de homocisteína, lo que está ligado a enfermedad cardiovascular.

Los polimorfismos en enzimas metabolizadoras de fármacos ocasionan diferencias en la respuesta al tratamiento y en efectos de éste entre pacientes, ya que la biotransformación de cada compuesto puede variar, según el genotipo del individuo. Los SNP en estas enzimas han servido para identificar de forma temprana efectos secundarios a fármacos, incompatibilidad o resistencia a terapias y variación en la eficacia de medicamentos. Todo esto ayuda al médico en la toma de decisiones de la terapéutica adecuada para cada paciente. A este proceso se le conoce como medicina personalizada.

Para la farmacogenética es de gran utilidad el estudio de los genes *CYP450*, entre ellos el *CYP2D6*, que metaboliza una gran cantidad de fármacos y presenta múltiples variantes alélicas. Se definen cuatro fenotipos, de acuerdo con la actividad que presente su producto génico, es decir, si serán metabolizadores rápidos, funcionales, lentos o pobres (sin función enzimática). Todo ello conlleva implicaciones clínicas importantes. Por un lado, en un metabolizador lento o pobre la permanencia en la célula de los compuestos o sus formas reactivas más tiempo del necesario podría ocasionar toxicidad, debido a la falta de uno de los alelos funcionales (lento) o por tener alelos que producen variantes poco funcionales de la enzima (isoenzimas) o carecer de la enzima (pobre). Por otro lado, un metabolizador rápido (o ultrarrápido) puede tener más de dos copias del alelo activo, lo que produce enzimas altamente funcionales con actividad enzimática acelerada, de manera que el compuesto se metaboliza tan rápido que posiblemente pierda eficacia.

También son importantes los polimorfismos de acetilación de genes involucrados en el metabolismo de una gran variedad de compuestos con arilaminas e hidracinas, además de carcinógenos. Estos compuestos son metabolizados por la enzima citosólica N-acetiltransferasa (NAT2), donde la identificación de polimorfismos se ha asociado con una función disminuida de la enzima. A esto se le conoce como fenotipo acetilador lento y conlleva riesgo o susceptibilidad aumentada a padecer cáncer colorrectal o de vejiga.

Para el diagnóstico genético, el estudio de polimorfismos tipo SNP permite identificar variantes alélicas que se han asociado con riesgo de presentar enfermedades, sobre todo multifactoriales. Estas determinaciones ayudan a establecer programas de prevención, ya que al ser multifactorial, el componente ambiental tiene una gran importancia. Así, si se sospecha o existe la certeza de tener variantes génicas de riesgo es posible hacer cambios en diversos factores del estilo de vida que puedan desencadenar la enfermedad. Por ejemplo, diversos SNP se han asociado con la predisposición a padecer diabetes tipo 2, entre ellos SNP en el gen *PPARG* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma* o receptor de glitazona NR1C3, rs1801282 Pro12Ala, C/G), receptor nuclear implicado en el metabolismo de glucosa y en el catabolismo y almacenamiento de los ácidos grasos. El gen *ENPP1* (ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 o PC1, rs1044498 Lis121Gln, C/A), que codifica para una glucoproteína de membrana clase 2, se ha asociado con resistencia a la insulina. Además, el gen *IL6* (interleucina 6, rs1800795 -174, G/C) es citocina con funciones biológicas diversas, incluida la respuesta inmune. Además, en muchos de los SNP asociados se han encontrado variantes no sinónimas, de tal manera que el producto génico de la secuencia modificada tendría una alta probabilidad de conferir alteraciones funcionales.

Por otro lado, la tipificación de genomas microbianos permite determinar la distribución de los tipos microbianos en determinada población, su patogenicidad y resistencia a tratamientos o inmunogenicidad. Esto permite monitorizar poblaciones en riesgo de manera anticipada, identificar patrones de transmisión y crear nuevos fármacos o vacunas.

Métodos de detección de patrones polimórficos o huella de ADN

A fin de encontrar secuencias específicas con un patrón determinado que permitan el corte con enzimas de restricción o que puedan hibridarse para su detección, se emplean

varios abordajes comunes, basados en la homología de las secuencias de ADN con sondas específicas.

Según las reglas de Chargaff, el grado en el cual dos secuencias de ADN se complementen o emparejan se le llama homología. Una complementariedad total entre dos fragmentos de ADN demuestra una alta homología, mientras que una complementariedad sólo en una pequeña porción de pares de bases pone de manifiesto una baja homología.

Para detectar polimorfismos se pueden emplear diversas técnicas el Southern blot es un método ideal para detectar polimorfismos en el ADN, ya que mediante el uso de sondas específicas para identificar secuencias repetidas (VNTR o STR), localiza regiones de hibridación homólogas a una secuencia de interés. Asimismo, la PCR con enzimas de restricción y electroforesis permite localizar secuencias blanco (ver el capítulo 15, Técnicas de hibridación).

Existe también una técnica en la cual, mediante PCR, se amplifican regiones polimórficas que incluyen varios polimorfismos (*AmpFLP*). Esta técnica se ha automatizado y permite estudiar y crear árboles filogenéticos, basados en análisis comparativo de muestras de ADN individuales. Así, pueden distinguirse VNTR de manera sencilla y a un costo relativamente bajo, lo que hace a este tipo de métodos populares aun en laboratorios o países con bajos recursos.

Para el análisis de STR, los *loci* con STR, en primer lugar, se tratan con iniciadores específicos para amplificar fragmentos que contengan secuencias cortas (cuatro bases repetidas) con repeticiones continuas, para después ser separadas por electroforesis en gel o capilar, a fin de documentar el número de repeticiones y distinguir patrones de repetición que puedan compararse y asociarse con un estándar o blanco. Se debe contar con una secuencia de referencia para establecer o descartar asociaciones, por ejemplo, en una investigación criminal, contar con muestras de ADN obtenidas de una víctima, para que puedan compararse con la muestra del sospechoso.

Los STR son comunes, los comparten 5 a 20% de las personas, lo que obliga a la búsqueda de combinaciones de *loci* en reacciones multiplex, para lograr un método adecuado de discriminación e identificación precisa, al considerar siempre una secuencia base o de referencia con la cual hacer la comparación.

Controversias en el análisis de la huella genética

La identificación de polimorfismos para establecer un patrón genético o huella genética es útil en diversos campos de estudio. Por ejemplo, en ciencias forenses permite comparar sospechosos mediante muestras de sangre, cabello, saliva o semen, a fin de determinar responsabilidad o exoneración en juicios criminales. También es útil en la identificación de restos humanos, familiares extraviados, pruebas de paternidad, identificación de inmigrantes o personas indocumentadas, para establecer relaciones biológicas familiares para confirmar, por ejemplo, la situación legal de un menor, su nacionalidad u origen, y también son útiles para determinar la compatibilidad de órganos en trasplantes, así como para definir el origen y/o la composición de alimentos; incluso puede usarse en estudios evolutivos de poblaciones animales salvajes o para postular hipótesis acerca de la genética poblacional y las migraciones humanas a través del tiempo.

A pesar de que este método de identificación mediante la huella de ADN se considera equivalente al código de barras de un producto comercial, ya que cada persona tiene un patrón genético específico, hasta ahora los VNTR sólo dan evidencia de probabilidad (mayor o menor) de que el patrón genético analizado sea homólogo o concuerde con el de una persona en particular. Sin embargo, esta probabilidad estaría definida como de homología de 1 en 2 mil millones, lo que no descarta la posibilidad de que no lo sea o, lo que es más común, de que la técnica se haya llevado a cabo de manera poco confiable y haya error o falsos positivos. Esto se ha abordado con prontitud y actualmente existen normas y reglamentaciones universales de seguridad y precisión en el análisis de huella de ADN, que permiten minimizar el error técnico.

Para solventar estos problemas es útil la automatización de los procesos, así como el análisis de combinaciones de polimorfismos raros (o poco comunes entre las personas). Éstos permiten crear patrones que incrementan la probabilidad de que las muestras en comparación efectivamente coincidan, en el caso de identificar que provengan de la misma persona, o que correlacionen, en el caso de establecer relaciones biológicas familiares, considerando las variaciones debido a diferencias en raza o etnia. Todo ello involucra en gran medida a la genética de poblaciones para establecer relaciones entre líneas raciales.

En un futuro la huella del ADN podría ser una herramienta útil de identificación para todas las personas al nacer, aunque sobre este tema todavía existe controversia respecto a asuntos bioéticos. Hasta el momento existen bases de datos, sobre todo de carácter judicial, que permiten identificar a sospechosos en juicios criminales, lo que deja fuera a todas las personas que no hayan pasado por algún proceso de este tipo. Se plantea que solicitar la huella genética de cualquier persona sin alguna razón de carácter penal podría considerarse discriminatoria. Esto sería fácilmente rebatible si la prueba se aplicase a toda persona al nacer, ya que sería una forma de identificación personal válida y confiable; sin embargo, los costos que implica llevar a cabo el análisis para cada persona aún son muy altos, lo que lo vuelve de momento una alternativa no práctica y poco viable.

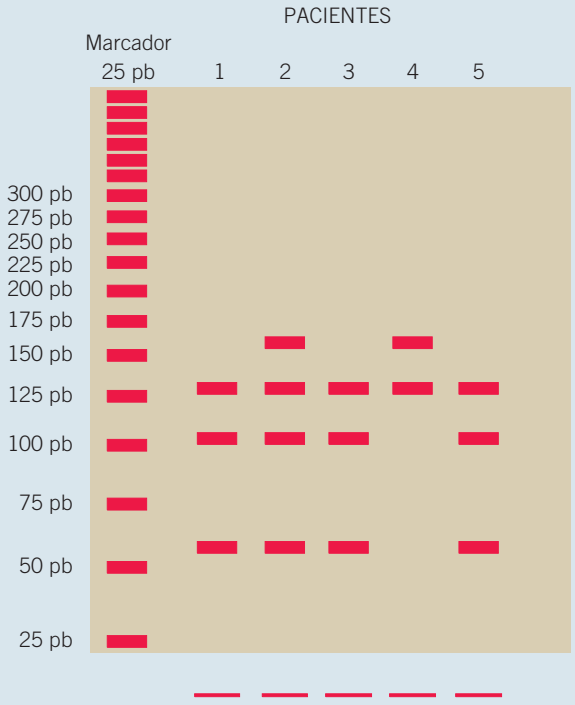
Otra implicación de carácter ético se refiere al diagnóstico genético, ya que realizar análisis de polimorfismos asociados a enfermedades produce resultados (positivos o negativos) que atañen a la familia por completo y no sólo al *propositus* o individuo en estudio. Ello, en ocasiones, ante enfermedades o situaciones delicadas, genera conflictos

entre lo que deben o no saber los demás miembros de la familia y/o cuánto poder tiene el *propositus* para evitar que dicha información pueda difundirse o utilizarse para otros fines, de carácter comercial o legal que pudieran afectarle en su vida laboral o personal. Éste sería el caso si las compañías aseguradoras pudieran definir primas específicas a personas con determinado patrón genético. Por otra parte, la identificación de factores de riesgo o predisposición a diversas enfermedades sería sumamente útil para la prevención y el tratamiento adecuados de las enfermedades y generaría beneficios médicos y socioeconómicos evidentes, sin dejar de lado por supuesto el estudio y el control del factor ambiental, con grandes implicaciones en el desarrollo y la expresión de cierto perfil genético.

Ejercicios de repaso

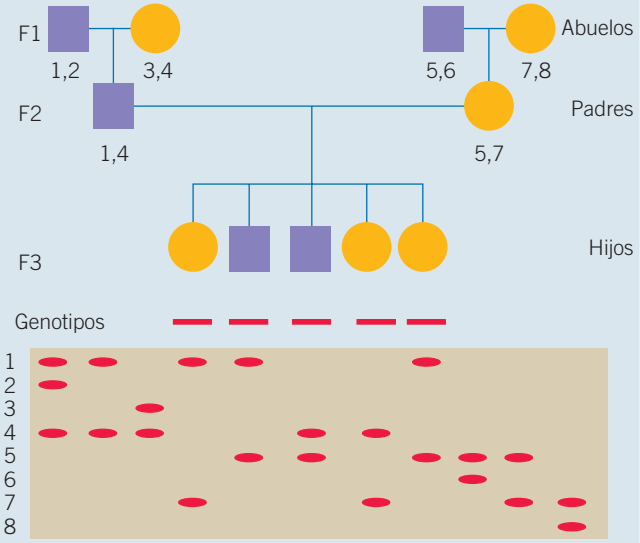
I. Identificación de fragmentos de restricción para genotipificar de forma diferencial homocigotos de heterocigotos:

1. Indique en la línea inferior de cada carril los genotipos correspondientes a los siguientes fragmentos de digestión, para cada una de las muestras de los pacientes representadas en el siguiente gel.
Fragmentos de digestión esperados:
GG (131, 103, 60 pb), GC (163, 131,103, 60 pb), CC (131 y 163 pb).
Enzima de restricción utilizada: *Bgl*II
Gel donde se muestra la digestión para el polimorfismo TGFB1+915 C>G

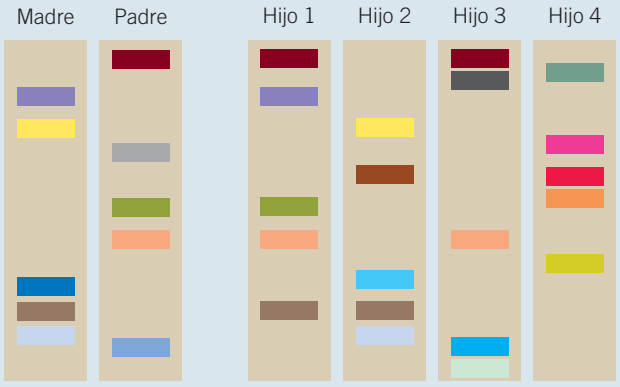


II. Identificación de parentesco a partir de la herencia de alelos

1. De acuerdo con el siguiente patrón de bandeo, identifique en la línea el genotipo de cada uno de los hijos en esta genealogía.



2. Considere el siguiente análisis de marcadores de una familia y, tomando como base los alelos distintivos de ambos padres, identifique y explique la filiación de cada uno de los hijos.



Bibliografía

Daniels M., Trowern A. Pharmacogenomics SNPing away. *Biochemist.* 2003:19-23.

Hartl D. *A primer of population* genetics, 3ª ed. Boston: Sinauer Associates; 2000.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature,* 1985;314:67-73.

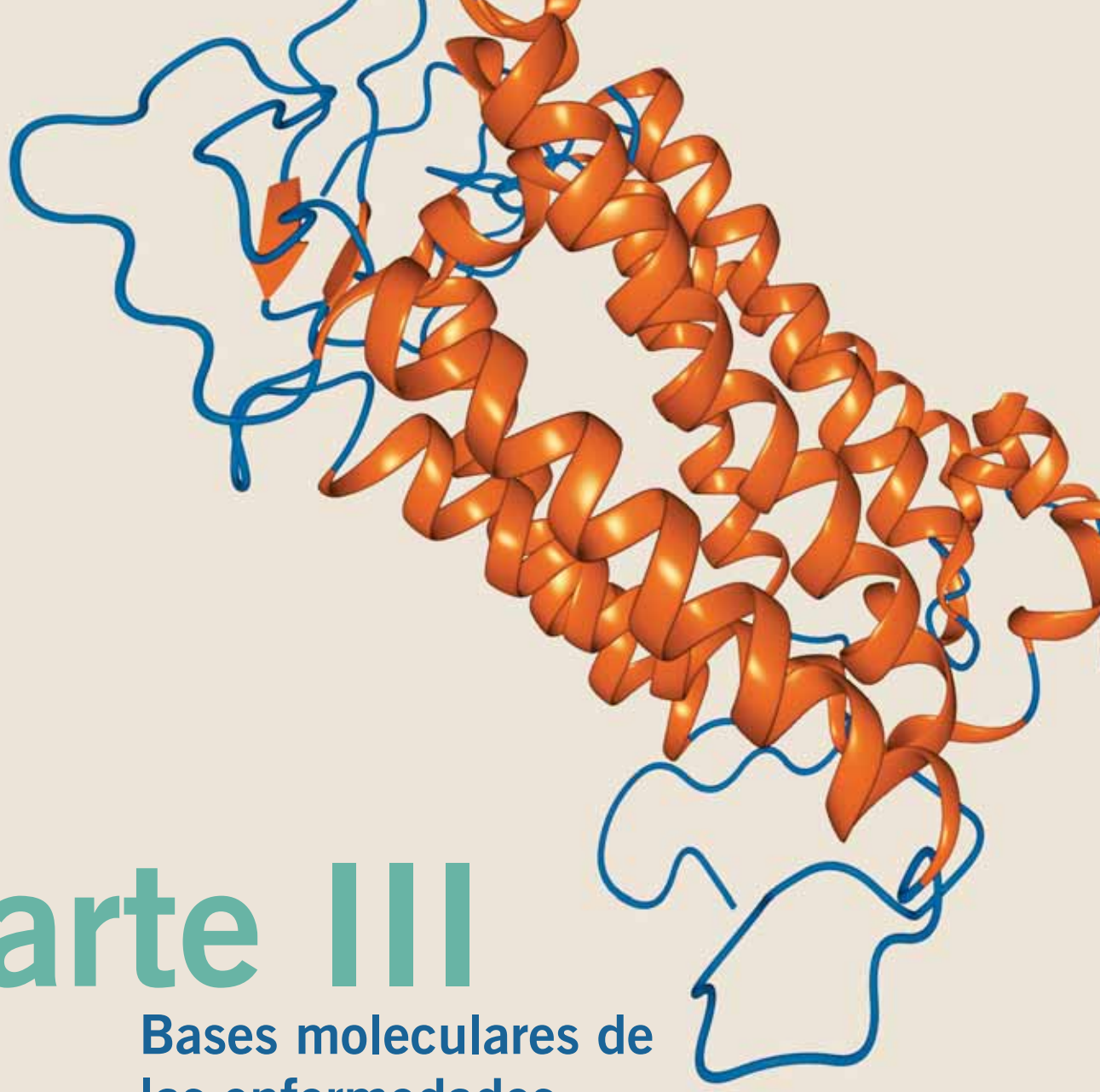
Jeffreys AJ, Wilson V, Thein S.L. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature,* 1985;316(6023):76-79.

Passarge E. *Color Atlas of Genetics.* Nueva York: Thieme Medical Publishers; 1995:411.

Suzuki D.T., Griffiths A.J.F., Miller J.H., Lewontin R.C., *Introducción al análisis genético.* Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1992:800.

Wang H., Kim R.A., Sun D., Gao Y., Wang H., Zhu J., *et al*. Evaluation of the effects of 18 non-synonymous single-nucleotide polymorphisms of CYP450 2C19 *on in vitro* drug inhibition potential by a fluorescence-based high-throughput assay. *Xenobiótica,* 2011;41(9):826-835.

Willer C.J., Bonnycastle L.L., Conneely K.N., Duren W.L., Jackson A.U., Scott L.J., *et al*. Screening of 134 single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously associated with type 2 diabetes replicates association with 12 SNPs in nine genes. Diabetes, 2007;56(1):256-264.

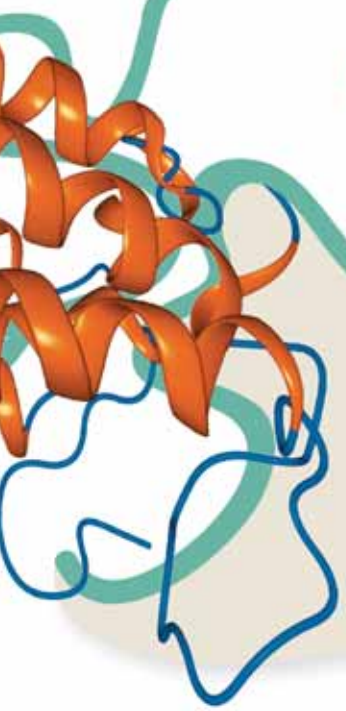


Parte III

Bases moleculares de las enfermedades

Contenido

Capítulo 19 Bases moleculares de las patologías humanas
Capítulo 20 Enfermedades monogénicas
Capítulo 21 Bases moleculares del cáncer
Capítulo 22 Bases moleculares de la diabetes mellitus
Capítulo 23 Bases moleculares de la obesidad
Capítulo 24 Bases moleculares de la hepatitis B
Capítulo 25 Bases moleculares de la hepatitis C
Capítulo 26 Bases moleculares del virus de la inmunodeficiencia humana



Capítulo 19

Bases moleculares de las patologías humanas

José Macías Barragán / Selene G. Huerta Olvera

Introducción

El desarrollo tecnológico en la biología molecular y, en especial, en la genética molecular ha abierto un sinfín de ventajas clínicas indiscutibles en la práctica médica diaria. La sensibilidad y la especificidad de las técnicas usadas en el diagnóstico directo de defectos genéticos o agentes etiopatogénicos asociados a los procesos mórbidos representan una herramienta valiosa en la medicina, a lo que hay que añadir la velocidad con la que se obtienen los resultados. Por ello, es esencial conocer cómo el ADN se replica, se transcribe y se traduce a proteínas (dogma central de la biología molecular), así como los mecanismos de expresión basal e inducible de genes en el genoma. Uno de los principales objetivos es conocer los mecanismos de regulación y expresión genética en los procesos de la enfermedad para tratar de detenerla e incluso prevenirla, ya que mediante estudios genéticos pueden saberse las probabilidades de que se presente en individuos susceptibles.

A partir del descubrimiento en que se relacionó que todas las enfermedades tienen una causa molecular, se han llevado a cabo grandes progresos para conseguir un tratamiento eficaz a dichas enfermedades. Cualquier enfermedad cursa, en mayor o menor grado, con alteraciones en la estructura, propiedades, metabolismo o función de una o varias biomoléculas.

Entre las causas que pueden inducir una enfermedad se encuentran agentes físicos (radiaciones, polvos, traumatismos, etc.), exposición a compuestos tóxicos (solventes, metales pesados, toxinas, etc.) o biológicos (virus, bacterias, parásitos, etc.) y trastornos de origen genético cuya etiología radica en la información genética contenida en el organismo.

Según la biomolécula alterada, las enfermedades también pueden clasificarse en hormonales, inmunológicas, nutricionales y metabólicas, entre otras. Con independencia de su clasificación, la enfermedad se encuentra dada por disfunciones celulares y/o tisulares, y genera cambios temporales o permanentes en el organismo así como variaciones en la función de órganos y sistemas, que en último término se reflejan en forma de padecimiento, incluso aquellas debidas a otras causas y que no se consideran de origen molecular.

Existen diferentes tipos de diagnóstico de una enfermedad de acuerdo con la información analizada:

1. El **diagnóstico clínico** se lleva a cabo a partir de la observación médica (exploración), con el apoyo de los datos de laboratorio (análisis clínicos, radiología e imagen, etc.), y se basa en un criterio fenotípico y de las manifestaciones bajo la forma de síndrome clínico.
2. El **diagnóstico molecular** de una enfermedad se basa en criterios genotípicos que alteran la constitución del genoma. Desde el punto de vista molecular, las enfermedades se pueden clasificar en: genéticas, exógenas y mixtas. Esta clasificación no es aceptada de forma generalizada, debido a que no se conoce con precisión la causa molecular de muchas enfermedades.

El objeto de estudio de la **patología molecular** es el conocimiento de la enfermedad desde el punto de vista de su alteración molecular para contribuir a su diagnóstico y terapéutica. A principios del siglo XX se estableció la expresión *errores congénitos del metabolismo* para describir alteraciones hereditarias presentes durante la vida del paciente, que afectan vías metabólicas específicas, debido a la ausencia o a la falta de actividad de moléculas particulares (en su mayoría enzimas), como el albinismo, la alcaptonuria, cistinuria y galactosemia.

El inicio sistemático de la patología molecular tiene lugar en el decenio de 1950, con las técnicas que permiten el estudio de los cromosomas humanos y el conocimiento de su papel en el desarrollo sexual y de las anomalías cromosómicas relacionadas.

La **genómica** incluye el genoma, así como la aplicación de pruebas genéticas, para identificar las alteraciones responsables de una enfermedad. De manera análoga, la **transcriptómica** y la **proteómica** definen el papel que desempeña el ARN y las proteínas en el inicio o establecimiento de la enfermedad.

Clasificación molecular de las enfermedades humanas

Desde el punto de vista molecular, una enfermedad genética es una situación causada por un cambio, llamado *mutación*, que se presenta durante la replicación, transcripción o traducción de uno o varios genes. En general, dicha alteración interfiere con la producción de la proteína codificada por el gen que presenta dicha mutación. Las enfermedades genéticas se transmiten de generación en generación debido a que se originan por una alteración presente en las células madre, por lo que son de carácter hereditario. En cambio, alteraciones en las células somáticas no son hereditarias y sólo afectan al organismo que las desarrolla.

Las enfermedades genéticas pueden clasificarse según características específicas en **alteraciones genéticas, según su extensión**: *mutación puntual* (es la alteración de un solo nucleótido y la causa de las enfermedades monogénicas); *mutación mediana* (normalmente tiene lugar en secuencias repetidas, como los satélites o microsatélites, e implica la deleción o inserción de secuencias de más de dos nucleótidos), y finalmente, *mutación a gran escala* (pueden ser cromosómicas o citogenéticas, y afectan a cromosomas completos o a grandes fragmentos de ellos). Se distinguen translocaciones, deleciones o inserciones de fragmentos cromosómicos, además de anomalías en el número de cromosomas de la célula. Las alteraciones numéricas se deben a segregación cromosómica errónea, mientras que las anomalías estructurales o cromosomopatías lo hacen a reordenamientos cromosómicos.

Además, las enfermedades genéticas también pueden clasificarse en **alteraciones genéticas, según el genoma afectado**, ya que pueden presentarse en el genoma *nuclear* o **mitocondrial**; las primeras son más frecuentes, ya que el tamaño del material genético nuclear es mayor. A su vez, las alteraciones genéticas nucleares pueden clasificarse **según el tipo de cromosoma** afectado, ya que el defecto puede estar localizado en los *cromosomas sexuales* (cromosomas X o Y) o en los *cromosomas autosómicos* (22 pares). Esta distinción combinada con el carácter dominante o recesivo con el que se expresa la enfermedad es la clasificación más sencilla y la empleada de forma más común en genética.

Sin embargo, clásicamente, desde el punto de vista molecular, las enfermedades del ser humano se dividen en: 1) enfermedades monogénicas o mendelianas (nucleares y mitocondriales); 2) enfermedades exógenas, adquiridas o ambientales, y 3) enfermedades multifactoriales de origen complejo.

Enfermedades monogénicas

Enfermedades nucleares

Enfermedades hereditarias causadas por la mutación o alteración de un solo gen (o *locus*). También se les conocen como enfermedades mendelianas, ya que se transmiten en la descendencia según las leyes de Mendel. Se conocen más de 6000 enfermedades hereditarias monogénicas, con una prevalencia de un caso por cada 200 nacimientos. Si el alelo anormal aparece en ambos cromosomas homólogos, el individuo es ***homocigoto*** para dicha alteración, mientras que si lo hace en uno solo de los alelos cromosómicos se denomina ***heterocigoto*** para la mutación.

Para su inclusión en este grupo, la enfermedad ha de cumplir las siguientes características:

- Debe estar determinada genéticamente; es decir, deberse a mutaciones que alteran la secuencia o la organización del genoma codificante.
- Debe afectar a moléculas en cantidad, estructura, actividad o función. En especial, se alteran las proteínas, en cantidad o en actividad.
- La alteración bioquímica que afecta a estructuras celulares o vías metabólicas y causa la enfermedad debe ser el resultado de las alteraciones en las moléculas.

Las alteraciones monogénicas generan múltiples enfermedades; entre las más conocidas se encuentran: albinismo, anemia falciforme, daltonismo, distrofia muscular de Duchenne, hemofilias o hipercolesterolemia familiar, entre otras. Para obtener una mayor información acerca de estos temas se puede acceder por vía electrónica a la base de datos del OMIM (Online Mendelian Inheritence of Man; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim). Esta base de datos de consulta en línea es un catálogo actualizado de genes humanos y alteraciones genéticas. El OMIM se centra principalmente en las enfermedades genéticas heredables.

Algunos ejemplos de enfermedades monogénicas comunes son: anemia falciforme, fibrosis quística, enfermedad de Batten, enfermedad de Huntington (cromosoma 4), enfermedad de Marfan, hemocromatosis, deficiencia de alfa-1 antitripsina, distrofia muscular de Duchenne, síndrome de cromosoma X frágil, hemofilia A y fenilcetonuria. Cada enfermedad y gen tienen asignados un código de seis dígitos. A este número se le denomina código *MIM* (herencia mendeliana en el hombre, por sus siglas en inglés), en el cual se concentran las alteraciones genéticas heredadas y no heredadas. Además, es una base de datos referente al proyecto del genoma humano. A esta información se accede mediante el OMIM, que se actualiza a diario. Debido a los avances científicos que inducen un constante reordenamiento de las diferentes enfermedades genéticas es más aconsejable basarse en la versión *on line* que en la impresa.

Las enfermedades monogénicas (cuadro 19-1) se transmiten según los patrones hereditarios mendelianos y pueden clasificarse como:

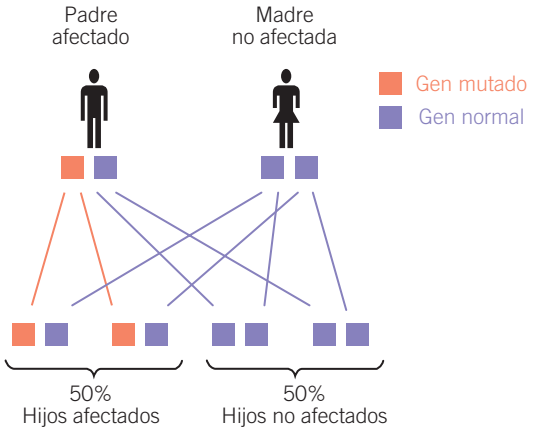
Enfermedad autosómica dominante. Sólo se necesita un alelo mutado del gen para que la persona manifieste una enfermedad autosómica dominante. Por lo menos uno de los dos progenitores de una persona afectada padece la enfermedad y este progenitor tiene 50% de probabilidad de transmitir el gen mutado a su descendencia, que manifestará la enfermedad (figura 19-1A).

Enfermedad autosómica recesiva. Para que la enfermedad se manifieste, se requiere que los dos alelos del gen se encuentren mutados en la persona afectada, cuyos padres en general no padecen la enfermedad, pero portan cada uno al menos una copia del gen mutado, por lo que pueden transmitirlo a la descendencia. La probabilidad de tener un hijo afectado por una enfermedad autosómica recesiva entre dos personas portadoras de una sola copia del gen mutado (que no manifiestan la enfermedad) es de 25% (figura 19-1B). Una de las enfermedades genéticas más comunes e importantes de tipo autosómica recesiva son las hemoglobinopatías, como por ejemplo la anemia falciforme, también llamada anemia drepanocítica o enfermedad de la hemoglobina SS (Hb SS). Esta afección es el resultado de la sustitución de adenina por timina en el gen de la globina beta, lo que conduce a una mutación de ácido glutámico por valina en la posición 6 de la cadena polipeptídica de globina beta y a la producción de una hemoglobina funcionalmente defectuosa, la hemoglobina S. Debido al cambio de ese aminoácido, las moléculas de hemoglobina se agregan formando fibras y dándole al hematíe su característica forma de hoz. Aunque esta enfermedad está presente al nacer, generalmente los síntomas no ocurren hasta después de los cuatro meses de edad. Esta anemia puede volverse potencialmente mortal y los pacientes pueden presentar "crisis" o episodios dolorosos y agudos causados por vasos sanguíneos bloqueados y órganos dañados. Se conocen varios tipos de crisis: *crisis hemolítica* (cuando se dañan los glóbulos rojos), *crisis de secuestro esplénico* (cuando el bazo se agranda y atrapa células sanguíneas) y *crisis aplásica* (cuando una infección hace que la médula ósea deje de producir glóbulos rojos). Estas crisis dolorosas, que ocurren en casi todos los pacientes en algún momento de sus vidas, pueden durar de horas a días y afectar los huesos de la espalda, los huesos largos y el tórax. Algunos pacientes presentan un episodio con intervalos de unos cuantos años, mientras que otros, muchos episodios por año. Estas crisis pueden ser tan graves que requieren hospitalización para el control del dolor. Además, las crisis repetitivas pueden ocasionar daños a los riñones, los pulmones, los huesos, el hígado y el sistema nervioso central (figura 19-1).

Enfermedad ligada al cromosoma X. Se manifiesta en las mujeres con una mutación en, por lo menos, uno de los alelos de un gen presente en el cromosoma X, mientras en los hombres se manifiesta en aquellos que presentan el alelo mutado en el único cromosoma X que portan. Tanto los hijos como las hijas de una madre afectada en uno de sus alelos tienen 50% de probabilidades de estar afectados, aunque la manifestación de la enfermedad es generalmente más leve en mujeres que en varones, por la compensación que realiza el alelo no-mutado en las mujeres (figura 19-2).

Los varones afectados sólo transmiten la enfermedad a sus hijas y sus hijos nacerán sanos. Estas enfermedades pueden transmitirse a su vez de forma dominante (figura 19-2A) o recesiva (figura 19-2B). En el cuadro 19-2 pueden observarse algunos ejemplos de estos tres tipos de enfermedades.

A. Patrón de herencia autosómica dominante



B. Patrón de herencia autosómica recesiva

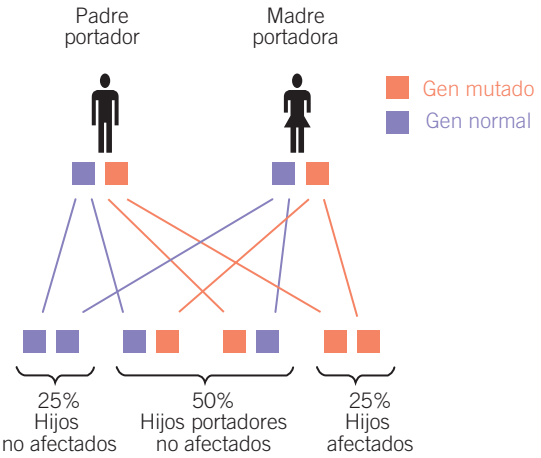


Figura 19-1. Patrón de herencia autosómica dominante A) y recesiva B). Los rasgos autosómicos se asocian con un único gen en un autosoma (cromosoma no sexual). Se le llama dominante porque un solo ejemplar heredado de cualquiera de los padres es suficiente para causar la aparición de este rasgo. El carácter autosómico recesivo es un patrón de herencia de un rasgo, enfermedad o trastorno que se transmite a través de las familias. Para que un rasgo o enfermedad recesiva se manifieste, dos copias del gen (o los genes) responsable (s) de la aparición de ese rasgo o alteración tienen que estar presentes en el genoma del individuo.

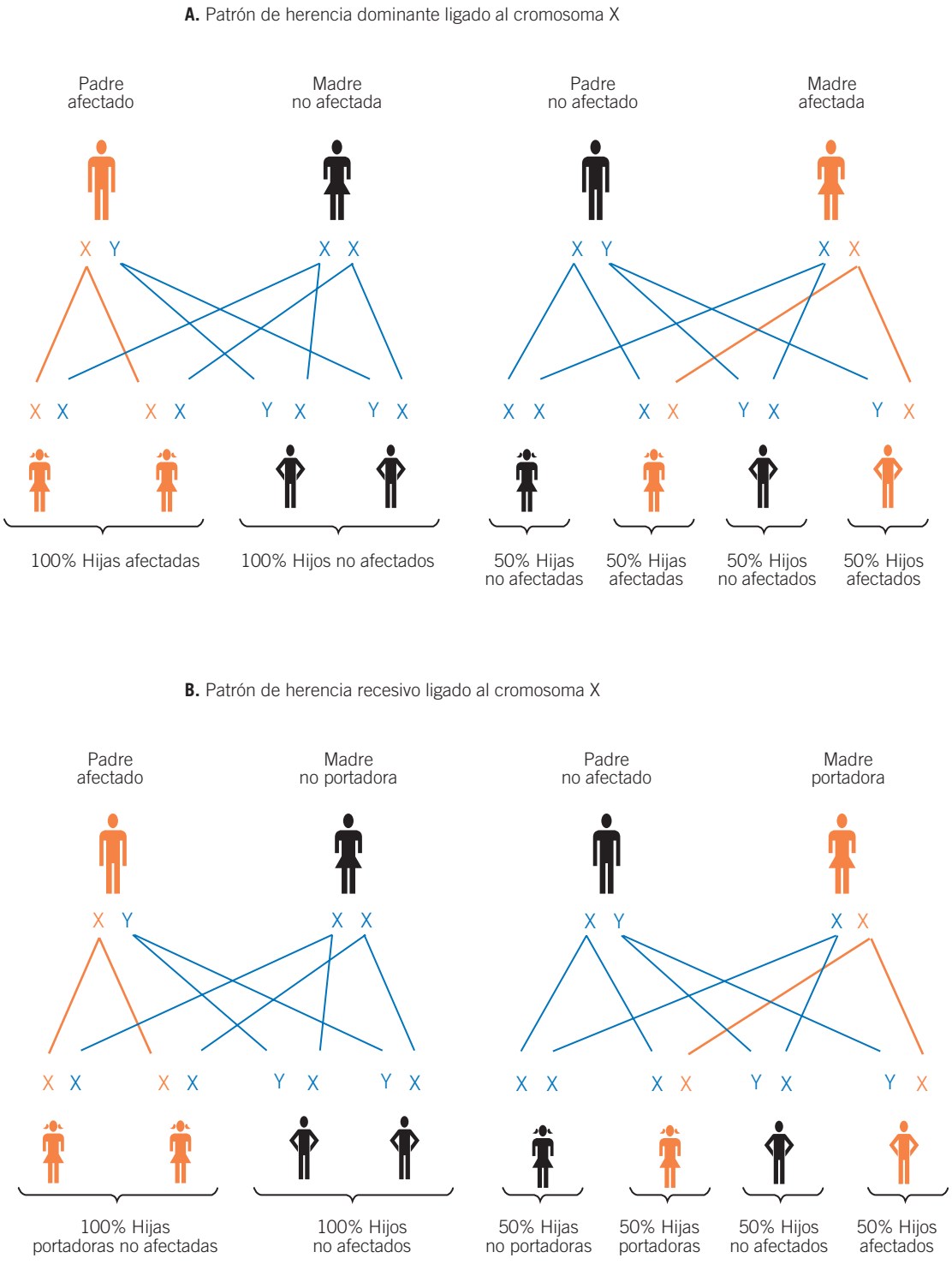


Figura 19-2. Patrón de herencia autosómica dominante A) y recesiva B) ligada al cromosoma X. Los genes ligados al cromosoma X se encuentran en el cromosoma sexual X y, tal como los genes autosómicos, tienen tipos recesivos y dominantes. Las alteraciones recesivas ligadas al cromosoma X raramente se ven en mujeres y usualmente afectan únicamente a hombres. Esto se debe a que los hombres heredan su cromosoma X (y todos los genes ligados a X) de su madre. Los padres únicamente pasan su cromosoma Y a sus hijos varones, así que ningún rasgo ligado a X es pasado de padre a hijo. Las mujeres expresan alteraciones ligadas a X cuando son homocigotas para el mismo y se convierten en portadoras cuando son heterocigotas

Cuadro 19-1. Enfermedades monogénicas asociadas al brazo largo del cromosoma 21 humano.

Enfermedad	OMIM	Gen	Herencia
Alzheimer familiar (a)	104300	APP(Y00264)	AD
Esclerosis lateral amiotrófica	105400	SOD1(X02317)	AD
Síndrome poliglandular autoinmune de tipo	240300	AIRE(Z97990)	AR
Homodistinuria	236200	CBS(L00972)	AR
Epilepsia mioclónica progresiva de Unverricht y Lindborg	254800	CSTB	AR
Trastorno hereditario de las plaquetas asociado a predisposición a sufrir leucemia mielogénica aguda	151385	RUNX1(AML1)	AD
Síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria	116920	ITGB2	AR
Sordera no sindrómica recesiva 8 (DFNB8)	601072	TMPRSS3	AR
Sordera no sindrómica recesiva 10 (DFNB10)	605316	TMPRSS3	AR
Sordera no sindrómica recesiva 29 (DFNB29)	605608	CLDN14	AR
Síndrome de Usher tipo 1E	602097	–	AR
Síndrome de Knoblock	267750	COL18A1	AR
Holoprosencefalia tipo 1	236100	–	AR
Deficiencia múltiple de las carboxilasas	253270	HLCS	AR
Síndrome de Jervell y Large-Nielsen (b)	220400	KCNE1	AR
Cataratas congénitas de herencia autosómica dominante	123580	CRYA1	AD
Miopatía de Bethlem (C)	158810	COL6A1, COL6A2	AD
Síndrome de Longo QT6	603796	KCNE2	AR
Micobacteriosis familiar atípica (d)	209950	IFNGR2	AR
Anemia hemofílica por deficiencia en fosfofructuocinasa	171860	–	AR
Deficiencia de enterocinas	226200	PRSS7	AR

Se indica el número de OMIM, el gen responsable y el tipo de herencia que presenta (AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva). (a) La mayoría de casos de enfermedad de Alzheimer son esporádicos y no presentan un patrón de herencia mendeliano. (b) Mutaciones en el gen *KVLQT1*, localizado en 11q15.5, también producen el síndrome de Jervell y Large-Nielssen. (c) Mutaciones en el gen *COL6A3*, localizado en 2q37, también producen miopatía de Betlem. (d) Mutaciones en los genes *INFGR1*, localizado en 6q23-q24, y *IL12RB1*, localizado en 5q31-q33, también producen micobacteriosis familiar atípica. (e) Mutación autosómica dominante en célula somática.

Enfermedades mitocondriales

Estas enfermedades son inducidas por la pérdida o disminución de la función mitocondrial de las células afectadas. Cuando ciertos intermediarios metabólicos no funcionan de forma adecuada, hay una crisis energética, lo que puede interrumpir algunas reacciones químicas importantes para la supervivencia celular. La herencia mitocondrial es una de las excepciones a los principios de transmisión mendeliana de las enfermedades monogénicas, ya que su herencia es exclusivamente por línea materna y se ven afectadas por la heterogeneidad genética o heteroplasmia. Algunos ejemplos de estas enfermedades son:

Síndrome de MELAS. También se denomina encefalomiopatía mitocondrial o acidosis láctica. Es un trastorno asociado con una mutación A-G en el ARNt, en la posición 3243 en 80% de los casos descritos, aunque se han notificado otras mutaciones. Los síntomas, además de la triada característica, pueden incluir migraña, vómitos, demencia, epilepsia, sordera, ataxia, retinosis pigmentaria, cardiomiopatía, disfunción tubular renal proximal y miopatía.

Síndrome de MERRF. El síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (*myoclonic epilepsy with ragged red fibers*) es una enfermedad que cursa principalmente con mioclonías y epilepsia. Está causado por varias mutaciones, pero cada una de ellas, de forma independiente, conlleva el desarrollo de la enfermedad. Entre 80 y 90% de los casos se da la mutación *A8344G* (hay una transición de adenina a guanina en la posición *8344* del gen). El síndrome de MERRF es una de las enfermedades con una mayor variabilidad en la expresión de su sintomatología, incluso dentro de una misma familia de afectados. El cuadro clínico de esta enfermedad suele comenzar durante la infancia o la adolescencia y puede incluir epilepsia mioclónica progresiva, degeneración neuronal progresiva, atrofia cerebral y cerebelar visible con técnicas de neuroimagen, demencia, fibras rojas rasgadas, que se observan en la biopsia del músculo, acidosis láctica, aumento de lactato en el líquido cefalorraquídeo (LCR), etcétera.

Síndrome de NARP. Es un trastorno neurodegenerativo y progresivo de inicio juvenil-adultez temprana. Está incluido dentro de las alteraciones de la fosforilación oxidativa. Los pacientes presentan debilidad muscular proximal, con neuropatía sensorial, ataxia y retinitis pigmentaria. La forma de inicio infantil, MILS (síndrome de Leigh de herencia materna) se caracteriza por una encefalopatía asociada a

Cuadro 19-2. Diagnóstico de enfermedades monogénicas.

	Enfermedad	OMIM
Autosómicas recesivas	Fibrosis quística Atrofia muscular espinal (tipo 1 o de Werding-Hoffmann) Talasemia Anemia falciforme Incompatibilidad factor Rhesus D	219700 253300 141900 603903 (*141900) *111680
Autosómicas dominantes	Distrofia miotónica o enfermedad de Steinert Huntington Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth Enfermedad AD riñón poliquístico	160900 (*605377) *143100 118220 (*159440) 600666
Ligadas al cromosoma X	Síndrome de Marfan (MFS) Síndrome de X frágil Distrofia miotótica de Duchenne (DMD) y DM Becker (DMB) Hemofilia A	154700 (1*34797) 309550 310200 306900

El diagnóstico de estas enfermedades en el genoma es un proceso largo y complicado que puede acortarse significativamente gracias a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada uno de los genes de interés se puede amplificar con cebadores específicos para, posteriormente, secuenciarlos y detectar la existencia de mutaciones. El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es el estudio del ADN en embriones humanos, con el propósito de detectar aquellos que portan algún defecto congénito. En este método a partir de la blasómera se extrae el ADN hasta de una sola célula, y la secuencia que se pretende estudiar es amplificada por PCR con los cebadores específicos. Es fundamental tomar las precauciones necesarias para amplificar el material de una única célula (dos alelos, una copia cada uno) sin contaminación de otros tipos celulares.

lesión bilateral y simétrica de ganglios basales. El gen *MTA-TP6* es el único asociado a NARP. Más 50% de los individuos afectados presentan una mutación en el nucleótido 8993 de este gen (T8993G).

Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) o atrofia óptica de Leber. Es una degeneración de los gangliocitos de la retina y sus axones que conlleva una pérdida aguda o subaguda de visión central. En la fase aguda, que dura algunas semanas, el ojo afectado muestra una apariencia edematosa de la capa de fibras nerviosas y microangiopatía, y afecta sobre todo a hombres adultos jóvenes. La NOHL se debe habitualmente a una de tres posibles mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial. Estas mutaciones afectan a los nucleótidos de las posiciones 11.778, 3.460 y 14.484, respectivamente, en los genes de las subunidades ND4, ND1 y ND6, del complejo I de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias.

Enfermedades exógenas, adquiridas o ambientales

El origen de estas enfermedades no está determinado genéticamente y son producto de la interacción del individuo con agentes externos. Según su origen, se clasifican en:

a) ***Enfermedades biológicas.*** Ocasionadas por agentes microbiológicos, como parásitos, bacterias, hongos, virus o priones. Algunos de los ejemplos más representativos de estas enfermedades son:

Virus: virus de inmunodeficiencia humana (agente causal del sida), virus de papiloma humano (asociado al cáncer cervicouterino), virus herpes zóster (principal agente de varicela).

Bacterias: *Staphylococcus aureus* (agente causal de síndrome séptico), *Streptococcus pyogenes* (el grupo A, productor de la faringitis purulenta y en ocasiones de la fiebre reumática y escarlata).

Priones: proteínas que producen degeneración del sistema nervioso central (inducen la enfermedad de Creutzfeld-Jacob –ECJ– en humanos, encefalopatía espongiforme bovina o enfermedad de las vacas locas en reses y *scrapie* en ovejas). Hay tres clases principales de la enfermedad de ECJ: puede ser *adquirida* a través del consumo de partes de animales infectados, sobre todo tejidos nerviosos, pero también puede ser *esporádica* o *hereditaria*.

b) ***Enfermedades nutricionales.*** Alcoholismo, anemia ferropénica, deficiencia de ácido fólico y vitaminas.

c) ***Enfermedades ambientales.*** Se subdividen en:

Físicas: traumatismos o accidentes.

Químicas: intoxicación por medicamentos o xenobióticos, envenenamiento por gases tóxicos (monóxido de carbono), quemaduras por componentes químicos (ácidos, álcalis, líquidos flamables).

Varios de los ejemplos anteriores son condicionados o exacerbados por factores como el área geográfica, el clima, la urbanización o las políticas sociales, que aumentan la vulnerabilidad humana a padecer enfermedades de tipo exógeno. Como ejemplo de estos factores cabe mencionar el aumento de la temperatura en las tierras altas, las guerras y el calentamiento global.

Enfermedades multifactoriales o de origen complejo

A diferencia de las enfermedades monogénicas, la manifestación clínica de enfermedades multifactoriales es un reflejo del efecto combinado o interacción acumulativa de alteraciones producidas por factores genéticos (mutaciones múltiples, a veces simultáneas, en un número impreciso de

genes) y factores ambientales o exógenos (efecto nutricional, agentes tóxicos, estrés oxidativo, factores psicológicos, etcétera).

En cualquier caso, la complejidad del origen dificulta un diagnóstico preciso, lo que ha llevado a que una misma enfermedad reciba distintos nombres. Como no se trata de trastornos de un único gen, la herencia de estas alteraciones no sigue la genética clásica mendeliana; a pesar de ello, son más comunes dentro de una familia que entre individuos no emparentados. Para que el síndrome se presente en otro miembro de la misma familia es necesario que se reúna una combinación de cambios génicos y medioambientales. Entre estas enfermedades pueden citarse ***malformaciones congénitas*** (labio leporino, cardiopatías congénitas, anencefalia, espina bífida, malformaciones congénitas del sistema digestivo y respiratorio, etc.), que se manifiestan desde el nacimiento y pueden ser producidas por un trastorno durante el desarrollo embrionario o el parto, o como consecuencia de un defecto hereditario. Las exposiciones a productos químicos o radiaciones en el medio ambiente pueden inducir resultados reproductivos adversos, como reducción en la fertilidad, abortos espontáneos, bajo peso al nacer, malformaciones y deficiencias del desarrollo. Otra categoría son las ***enfermedades de la edad adulta*** (algunos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y presión arterial elevada, artrosis, artritis, Alzheimer, Parkinson, sordera, ictus, demencia senil y diabetes mellitus); en todas estas enfermedades se ha observado una predisposición genética. Las condiciones en las que se transcurre por la vida adulta obedecen a diversos factores de índole personal, familiar y cultural. Entre los factores con un papel decisivo en la incidencia de estas enfermedades se incluyen el consumo prolongado de ciertos medicamentos y drogas, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol, el sedentarismo, la nutrición inadecuada y dietas hipercalóricas. Por ejemplo, entre los principales factores ambientales que incrementan el riesgo de presentar diabetes tipo 2 son la nutrición excesiva y una forma de vida sedentaria, con el consiguiente sobrepeso y obesidad. Un tratamiento completo de la diabetes no sólo debe incluir la disminución de calorías consumidas y ejercicio físico moderado y habitual, sino también un control médico constante. De igual manera, el nivel educativo, los ingresos, las funciones sociales y las expectativas personales influyen en la modificación de los hábitos de vida, que serán condicionantes del futuro envejecimiento.

Rastreo y diagnósticos en las afecciones genéticas

Se debe sospechar una afección genética cuando un niño presente: bajo peso, un tamaño pequeño para su edad gestacional, hipotonía, malformaciones externas e internas, dismorfias, dificultad para alimentarse, vómitos, somnolencia, convulsiones, etc. Los pilares del diagnóstico de una afección genética son: *historia clínica, examen físico* y *exámenes de laboratorio.* A continuación, se hace referencia a estos últimos exámenes, ya que complementan el diagnóstico clínico. Los exámenes de laboratorio se pueden realizar para:

- *Rastreo de poblaciones en riesgo*: cuando se tienen sospechas de que el producto puede ser portador de la enfermedad por antecedentes familiares, se obtiene una muestra de vellosidad coriónica después de la semana 10 de gestación. Ésta es la forma más común de diagnóstico prenatal en poblaciones de riesgo, como por ejemplo en la enfermedad de Tay-Sacks en judíos.
- *Rastreo familiar de portadores*: se lleva a cabo para determinar qué personas son portadoras del gen y, por tanto, pueden transmitir la enfermedad a sus hijos. El objetivo de estas pruebas es evitar que dos personas portadoras tengan hijos entre ellos.
- *Programa de tamiz neonatal* (*screening*): constituye una prioridad dentro de la atención en problemas de salud pública, ya que busca en una población a los individuos que presentan alguna característica fuera de lo normal o que haga sospechar de la presencia de una enfermedad, para su posterior tratamiento. Este método se realiza a partir de gotas de sangre, lo que hace posible determinar una amplia gama de moléculas. Entre los principales padecimientos que se detectan mediante este procedimiento son:
- *Alteraciones endocrinas*: hiperplasia adrenal congénita e hipotiroidismo congénito, fibrosis quística.
- *Alteraciones de las células de la sangre*: anemia falciforme.
- *Errores innatos del metabolismo de los carbohidratos*: galactosemia.
- *Errores innatos del metabolismo de los aminoácidos*: fenilcetonuria, homocistinuria y enfermedad de la orina con olor a jarabe de maple o arce, trastornos del ciclo de la urea, acidemias propiónica, metilmalónica e isovalérica.
- *Errores innatos del metabolismo de los ácidos orgánicos*: deficiencia de la biotinidasa.
- *Trastornos de la carnitina y de la oxidación de ácidos grasos*: trastornos neuromusculares, cardiacos o muerte súbita.
- *Problemas pulmonares y digestivos*: fibrosis quística.

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993 sólo establece como obligatoria la prueba para detectar el hipotiroidismo congénito (2011), afección causada por la disminución de la producción de la hormona tiroidea en un recién nacido, que puede ocasionar retardo mental severo y retraso en el crecimiento. También la Secretaría de Salud promueve el tamiz auditivo, para detectar sordera congénita e hipoacusia (disminución de la audición). Como ya se ha mencionado el **diagnóstico prenatal genético** se realiza mediante una biopsia de vellosidades coriales (amniocentesis), prueba de la alfa-fetoproteína en sangre materna (AFP), ecografía, cordocentesis, determinación de células fetales en sangre materna, fetoscopia, etc.,

para detectar enfermedades genéticas del producto durante el embarazo. En la actualidad, se dispone incluso de métodos de diagnóstico genético preimplantacional (análisis diagnóstico de una o más células embrionarias), que conlleva la selección embrionaria para la implantación de embriones no afectados.

Tratamiento y prevención de enfermedades genéticas

La mayoría de las enfermedades genéticas no tienen tratamiento definitivo o curativo y, en general, éstos son sintomáticos. Una vez realizado el diagnóstico (en el cuadro 19-2 se presentan algunas enfermedades que pueden detectarse mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, PCR) en forma pre o posnatal, existen medidas terapéuticas que mejoran la calidad de vida de los pacientes afectados.

Algunas enfermedades genéticas son tratables mediante la aplicación de **medidas paliativas**, como por ejemplo dietas de eliminación (fenilalanina en la fenilcetonuria), suplementación de cofactores (factor VIII de la coagulación en hemofilia), reemplazo de enzimas (glucocerebrosidasa en la enfermedad de Gaucher), trasplante de órganos (médula ósea en la talasemia) y medidas quirúrgicas tales como corrección (labio leporino). También es posible realizar **terapia preventiva** de enfermedad genética, como es el caso de la escisión quirúrgica del colon (colectomía) en la poliposis familiar. Para que una enfermedad genética pueda tratarse mediante terapia génica somática se requiere conocer el gen defectuoso que la produce y habitualmente se requiere contar con un modelo celular *in vitro* o modelo animal de la afección. El tratamiento mediante terapia génica de estas y otras enfermedades se describirá con más detalle en otro capítulo de este libro.

Ejercicios de integración

1. Desde un punto de vista molecular, ¿qué es una enfermedad de origen genético?
2. Mencione las dos principales características de las enfermedades monogénicas o mendelianas.
3. Para que una enfermedad autosómica se manifieste, ¿se requiere que los dos alelos del gen se encuentren mutados en la persona afectada?
4. **Caso clínico.** Describa a qué enfermedad se refieren las siguientes características: niña de 5 años que consultó por fiebre de 4 días. En la exploración física destacaban palidez cutánea y mucosa, subictericia y esplenomegalia. En la analítica sanguínea destacaban: Hb de 79 g/L, hematocrito de 27%, volumen corpuscular medio de 93.4 fl y reticulocitos de 3%. En el frotis de sangre periférica destacaban anisocitosis y policromasia. La prueba de estabilidad térmica fue positiva. La electroforesis mostró una banda difusa entre HbA2 y HbA. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) mostró una Hb no identificada, que correspondía a 12% del total. El estudio molecular demostró la mutación CD92 His * Pro, en estado heterocigoto, patrón que se repitió en la madre. Su expresividad clínica se agudiza tras la ingesta de fármacos oxidantes o infecciones. La HPLC permitió el diagnóstico diferencial entre los diferentes tipos de Hb.

Bibliografía

Mañú Pereira M.M., Coll Sibina M.T., García Mateos E., Vives Corrons J.L. Hemoglobinopathy Newcastle: use of chromatography and first case reported in Spain. *Med Clin* (Barc), 2008;130(12):455-458.

Negredo C., Monks E. A novel real-time ultrasonic method for prion protein detection using plasminogen as a capture molecule. *BMC Biotechnol,* 2007;7:43.

Jameson L., Kopp P. Genetics and Disease. En: Kasper D, Harrison T. *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 16ª ed. Nueva York: McGraw-Hill, 2005:365-409.

Luque J, Herráez A. *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud,* 1ª ed. Madrid: Harcourt, 2001:78.

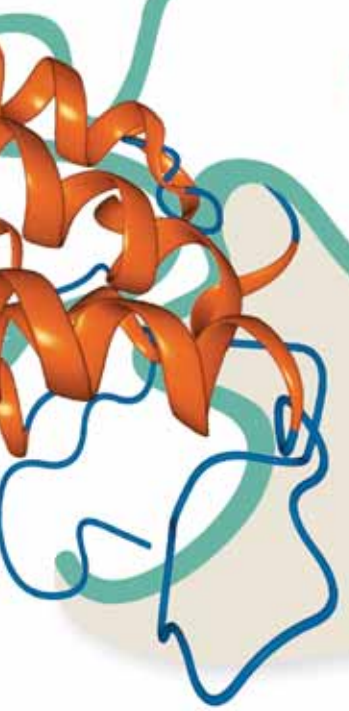
Hamosh A., Scott A.F. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res,* 2005;33:514-517.

Merson M.H. The HIV-AIDS pandemic at 25-the global response. *N Engl J Med,* 2006;23:2414-2417.

Moreno R., Aspillaga M. Frecuencia y características de la morbilidad genética en un hospital pediátrico. *Rev Chil Ped,* 1991;62:112-117.

McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns-Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM).* 18/09/2007. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim.

Scriver C., Beaudet A. *The metabolic and molecular bases of inherited disease,* Vol 3, 8ª ed. Nueva York: McGraw-Hill, 2001:3421-3452.



Capítulo 20

Enfermedades monogénicas

Silvia Mora Lee / Paola B. Castro García

Introducción

Las enfermedades monogénicas también se conocen como enfermedades hereditarias mendelianas. Se producen por alteración de un solo gen, de ahí su nombre. Alrededor de 1% de los niños nacidos vivos presentan alguna de estas enfermedades, de las que se conocen más de 6 mil.

Las enfermedades monogénicas pueden clasificarse según el patrón hereditario que presentan. Cuando la madre es portadora y el padre no presenta la mutación (cuadro 20-1), para cada uno de sus descendientes hay 50% de probabilidades de que si es varón presente la enfermedad y 50% de que si es mujer sea portadora del gen.

Cuadro 20-1. Hombre normal emparejado con mujer portadora: $X_H/Y \times X_H/X_h$

	X_H	Y_h		
X_H	X_H/X_H	X_H/X_h	Hijas: normales portadoras	50% 50%
Y	X_H/Y	X_h/Y	Hijos: normales portadores	50% 50%

En el caso de que el padre esté afectado y la madre no (cuadro 20-2), dado que el padre sólo puede transmitir el cromosoma Y, todos los hijos nacerán sanos; sin embargo, todas las hijas serán portadoras de la enfermedad, ya que recibirán el cromosoma X paterno.

Cuando el padre esté afectado y la madre sea portadora (cuadro 20-3), 50% de las hijas serán portadoras heterocigotas, mientras que el otro 50% serán homocigotas, por lo que estarán afectadas; 50% de los hijos nacerán sanos y el otro 50% estarán afectados, dado que reciben el alelo de la enfermedad de su madre.

Ciertas enfermedades importantes están causadas por genes recesivos ligados al cromosoma X, como por ejemplo la hemofilia y la enfermedad de Duchenne.

Cuadro 20-2. Hombre afectado emparejado con mujer normal: $X_h/Y \times X_H/X_H$

	X_H	X_H	
Xh	X_H/X_h	X_H/X_h	Hijas: todas son portadoras
Y	X_H/Y	X_H/Y	Hijos: ninguno está afectado

Hemofilia

La hemofilia es una coagulopatía crónica, congénita, hereditaria ligada al cromosoma X, por lo que los varones la padecen y las mujeres son portadoras. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de hemorragias tanto internas como externas debido a la deficiencia funcional cuantitativa de algún factor de coagulación.

Cuadro 20-3. Hombre afectado emparejado con mujer portadora: $X_h/Y \times X_H/X_h$

	X_H	X_h		
Xh	X_H/X_h	X_h/X_h	Hijas: portadoras, afectadas	50% 50%
Y	X_H/Y	X_h/Y	Hijos: normales, afectados	50% 50%

Los factores de coagulación son un grupo de proteínas responsables de activar el proceso de coagulación. Se han identificado 13 factores (I, II, … XIII). Los factores de coagulación actúan en cascada, es decir, uno activa al siguiente. Cuando hay carencia o déficit de algún factor de coagulación, la sangre tarda más tiempo en formar el coágulo y, aunque llegue a formarse, éste no es consistente y no se detiene la hemorragia.

Antecedentes históricos de la hemofilia

Los primeros datos históricos que se conservan sobre la hemofilia datan del siglo II a. C., cuando los rabinos Rabbi Judah y Rabbi Simon ben Gameliet observaron que algunos niños sangraban demasiado al practicarles la circuncisión; por ello, aplicaron diversas normativas en su obra judaica, conocida como el *Talmud*, y declararon que un niño que tuviese hermanos mayores con problemas de sangrado no tenía que ser circuncidado, ni tampoco los niños cuyos primos (hijos de las hermanas de su madre) se hubiesen desangrado.

En 1803, el médico estadounidense John Conrad Otto demostró que la enfermedad estaba ligada al cromosoma X, que ésta quedaba limitada a los varones y que las mujeres eran únicamente portadoras. La reina Victoria portaba esta enfermedad y la transmitió a gran parte de la realeza europea, entre ellos a su hijo Leopoldo, que murió a los 31 años de edad a causa de una hemorragia cerebral tras una caída. El caso más famoso de esta enfermedad es el zar de Rusia, Alexis Nikolavevich Romanoff. La enfermedad le fue transmitida por su madre, Alexandra de Hasse, nieta de la reina Victoria. Por ello, a esta enfermedad se la conoce como "enfermedad de reyes".

Esta afección se clasifica según la deficiencia de la actividad del factor de coagulación. Sólo existen dos tipos de hemofilia heredada: la hemofilia A, que se caracteriza por la deficiencia del factor XIII de coagulación, y la hemofilia B, que afecta al factor IX. Tanto el factor XIII como el IX se encuentran sólo en el cromosoma X. Según el nivel de factores de coagulación en la sangre se han diferenciado tres niveles de gravedad de la hemofilia: grave, moderada y leve (cuadro 20-4).

Cuanto más grave es el nivel de hemofilia, más hemorragias se presentan. El nivel de actividad de los factores de coagulación depende del tipo de mutación; así, las mutaciones que dan lugar a cambios muy pequeños como mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones, todas ellas de tipo *missense* (aparición de un codón correspondiente a un aminoácido distinto), generan una proteína con mayor funcionalidad (encontradas en pacientes con hemofilia moderada o leve), que las que tienen lugar en los pacientes que han sufrido grandes mutaciones, como inversiones o translocaciones, o las anteriormente mencionadas de tipo *nonsense* (aparición de un codón de parada que produce la interrupción temprana de la síntesis del factor VIII), que producirán una hemofilia A grave. Aunque, en general, se da este patrón, cabe destacar que se han dado casos en los que una misma mutación puntual en diferentes pacientes da lugar a distintos niveles de hemofilia. Se postula que esto podría deberse a otras mutaciones no detectadas.

Cuadro 20-4. Clasificación de gravedad en hemofilia

Clasificación	% de actividad del factor (VIII, IX)
Grave	Menor a 1
Moderada	1 a 5
Leve	5 a 40

Hemofilia grave

Las personas con hemofilia generalmente se diagnostican durante el primer año de vida, y sin el tratamiento profiláctico correcto presentan hemorragias internas frecuentes, aproximadamente una o dos a la semana, en su mayoría en los músculos o las articulaciones.

Hemofilia moderada

Las personas con hemofilia moderada, rara vez presentan sangrado espontáneo; sin embargo, sí tienen hemorragias prolongadas después de un traumatismo relativamente menor y en general se diagnostican antes de los 5 o 6 años. La frecuencia de los episodios de sangrado varía de una vez al mes a una al año.

Hemofilia leve

Las personas con hemofilia leve no presentan sangrados espontáneos, pero sí hemorragias anormales después de cirugías y extracciones dentales. La frecuencia de sangrado puede variar desde una vez al año a una vez cada 10 años. A menudo estos pacientes no se diagnostican hasta pasados varios años de vida.

En cualquier persona con hemofilia, los episodios de sangrado suelen ser más frecuentes en la infancia y la adolescencia que en la edad adulta. Así, aproximadamente 10% de las mujeres portadoras tienen riesgo de hemorragia y, por tanto, son portadoras sintomáticas, aunque los síntomas suelen ser leves. Cerca de uno de cada 5 mil varones nace con este trastorno, que no puede contagiarse, ya que se trata de una enfermedad hereditaria que se transmite de padres a hijos y sucesivas generaciones; no obstante, existen excepciones en las que se producen mutaciones espontáneas en individuos sin antecedentes en el historial familiar. Se considera que alrededor de 30% de los pacientes hemofílicos presentan la enfermedad presumiblemente por la adquisición de una mutación *de novo*, sin antecedentes familiares conocidos.

Hemofilia A

Esta enfermedad se caracteriza por la deficiencia de la actividad del factor VIII, cuyo gen tiene 186 kb de longitud, y es

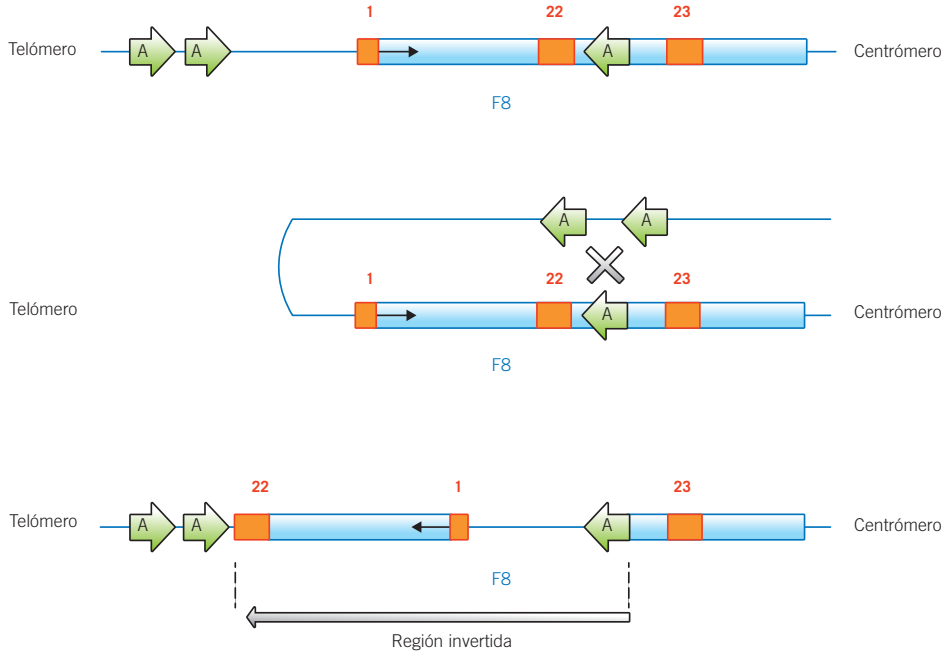


Figura 20-1. Representación de la mutación por inversión que sufre el gen F8. En la parte superior se muestra la localización de los intrones 1, 22 y 23, así como la posición de la secuencia repetitiva F8A en el gen F8. En la parte media se muestra el bucle que probablemente se genera alrededor del cromosoma X durante la inversión del intrón 22. Como consecuencia de homología > 90% de los intrones 1 y 22 pueden ocurrir dos posibles inversiones, aunque la recombinación con el intrón 1 se da con mucha menor frecuencia probablemente debido a las limitaciones físicas. En el panel 3 se representa el resultado obtenido con la inversión con el intrón 22.

uno de los más largos que se conocen. Contiene 26 exones y 25 intrones y está localizado en la región distal del brazo largo del cromosoma X, en la banda Xq28. La mayoría de los exones son pequeños y tan sólo unos pocos cientos de nucleótidos de longitud, a excepción de los exones 14 y 16; el exón 14 tiene 3 kb de longitud. Este exón codifica para el dominio B de la proteína FVIII. Este gen produce un ARNm de 9 kb. Los intrones 1 y 22 son notablemente grandes y presentan repeticiones de secuencia, las cuales se presentan en otros lugares en el cromosoma X. Estas regiones repetidas se encuentran envueltas en dos inversiones intracromosómicas. Después del clonado del gen del FVIII, numerosos estudios detectaron mutaciones causales de la hemofilia A grave, moderada o leve, incluyendo casi todo tipo de mutaciones. Las inversiones en este gen representan aproximadamente 45% de las mutaciones en el FVIII causantes de hemofilia A grave. Se trata de una disrupción del gen ocasionada por una inversión que separa los exones 1-22 de los 23-26 (aproximadamente 500 kb). Esta inversión es el resultado de una recombinación homóloga intracromosómica que se debe a la presencia de las secuencias repetidas mencionadas anteriormente denominadas F8A. Dos de estas secuencias F8A se encuentran presentes en el brazo *q* del cromosoma X situado *upstream* (corriente arriba) del gen del factor VIII y otra dentro del intrón 22 del gen. Esto hace que puedan producirse dos tipos de inversión: proximal o distal, según con cuál de las dos repeticiones situadas *corriente arriba* recombine, aunque ambas tendrán un fenotipo de hemofilia grave, ya que esta división impedirá generar una proteína funcional. Entre ambas variantes se ha estimado que aproximadamente 80% corresponde a la inversión distal y 20% a la proximal (figura 20-1).

La proteína madura del factor VIII de coagulación tiene 2 332 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 265 000 daltons, y se expresa con un péptido señal de 19 aminoácidos. La proteína tiene dominios de estructura repetitivos A y C, además de un único dominio largo B (figura 20-2).

El factor VIII se sintetiza principalmente en el hígado y su concentración en el plasma es inferior a 0.1 mg/ml. En la circulación, el factor VIII se estabiliza al unirse al factor de von

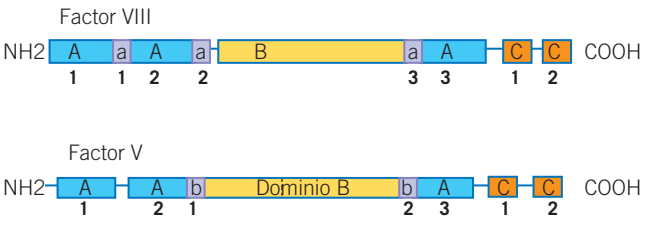


Figura 20-2. Esquema del gen del factor VIII. El factor VIII tiene una estructura de dominios repetidos A y C más un dominio único largo denominado B. Muestra una similitud de 35% en el gen del factor V.

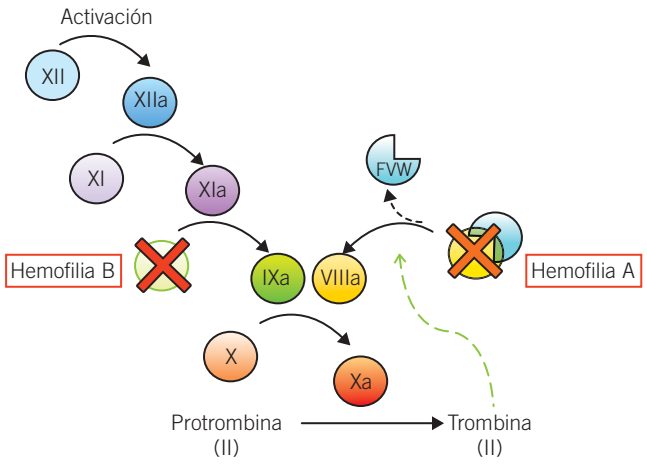


Figura 20-3. Vía intrínseca de coagulación. En el esquema de la cascada de coagulación se indica con una cruz naranja el punto en el que se interrumpe la vía en la hemofilia A y con una cruz roja donde se interrumpe con la hemofilia B. Los defectos ya sean en *F8* o *F9* dan como resultado los mismos síntomas, esto es, se trunca la formación del coágulo.

Willebrand (FVW). Una vez activados por pequeñas cantidades de trombina, es liberado del FVW, se une a fosfolípidos de membrana, interactúa con el factor IXa y activa el factor X durante la vía intrínseca de la coagulación (figura 20-3).

Hemofilia B

Esta enfermedad se caracteriza por deficiencia en la actividad del factor IX de la coagulación. Aproximadamente 10% de las mujeres portadoras tienen una actividad fisiológica inferior a 30%, con independencia de la gravedad de la hemofilia B. El gen *F9* es más pequeño que *F8* y sólo consta de 34 kb de longitud, y de 8 exones y 7 intrones. Se encuentra situado en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X, en la banda Xq27. En esta misma región, en posición distal, se encuentra el *locus* correspondiente al gen de FVIII. El tamaño de los exones varía entre los 25 nucleótidos del exón 3 y los 1 935 nucleótidos del exón 8. La longitud de los intrones también presenta una gran heterogeneidad, y son de tan sólo 188 nucleótidos en el intrón 2 y de 9473 nucleótidos en el 6. Los 8 exones dan lugar a los dominios funcionales y prácticamente cada exón codifica para un dominio. Así, el exón 1 corresponde al péptido señal; el exón 2, al propéptido y a la región Gla, el exón 3 codifica para la región rica en aminoácidos aromáticos que hace de puente entre los dominios adyacentes; el exón 4 da lugar a la región EGF-1; el exón 5, a la región EGF-2; el exón 6 codifica para el péptido de activación, y finalmente, los exones 7 y 8 corresponden al dominio proteasa o catalítico.

El producto del gen *F9* es una proteasa de serina que se activa tras sufrir proteólisis específica por el complejo FVIIa-FT. Una vez activado, puede formar el complejo de activación de FX mediante la unión a FVIIIa, fosfolípidos de superficie y calcio. Modificaciones postraduccionales, como la glucosilación, la sulfatación, la fosforilación, la hidroxilación y la carboxilación, convierten los primeros 12 residuos en ácido g-carboxiglutámico (Gla). El dominio Gla se une a iones calcio y adopta una conformación capaz de unirse a una superficie de fosfolípidos durante la cascada de coagulación. Los dominios EGF-1 y EGF-2 se denominan así porque presentan una gran homología con los del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF). Ambos están situados en tándem y comprenden los residuos 48 a 127. Se encuentran dominios similares en otras serín proteasas, como el FX y FXII. En EGF-1 se encuentra una región de alta afinidad por el Ca^2, al igual que en el dominio Gla. El dominio contiguo es el péptido de activación, que es el dominio menos conservado entre las serín-proteasas; consta de 35 aminoácidos comprendidos entre los residuos Arg145 y Arg180, sobre los cuales actúa el FXIa. Sin embargo, sólo el corte proteolítico en Arg180 da lugar a la actividad catalítica del FIXa. El dominio proteasa o catalítico del FIX corresponde al de una típica serín-proteasa; es el dominio más grande y se extiende desde el residuo 181 al 415 (figura 20-4).

Figura 20-4. Esquema del factor IX de la coagulación. Se muestran los dominios que conforman el factor IX.

Cys	Arg	Lys	Lys	Thr	Gln	Normal
TGC	CGA	AAA	AAA	ACG	CAG	
Try	Arg	Lys	Lys	Thr	Gln	Sentido equivocado
TAC	CGA	AAA	AAA	ACG	CAG	
Cys	Stop					Sin sentido
TGC	TGA	AAA	AAA	ACG	CAG	

Figura 20-5. Mutaciones comunes en hemofilia. La mayoría de los pacientes de hemofilia tanto A como B tienen mutaciones de sentido equivocado o sin sentido, que pueden presentarse en cualquier posición del *F8* o *F9*. La gravedad de la enfermedad dependerá de la localización y la función particular del aminoácido afectado. Se muestra la secuencia nucleotídica normal y la secuencia aminoacídica resultante de ella. Una sustitución del nucleótido G>A remplaza Cys por Tyr. El panel inferior muestra una sustitución C>T, la cual remplaza una Arg por un codón de paro. Las mutaciones sin sentido aparecen en ambas hemofilias y están asociadas con hemofilias graves.

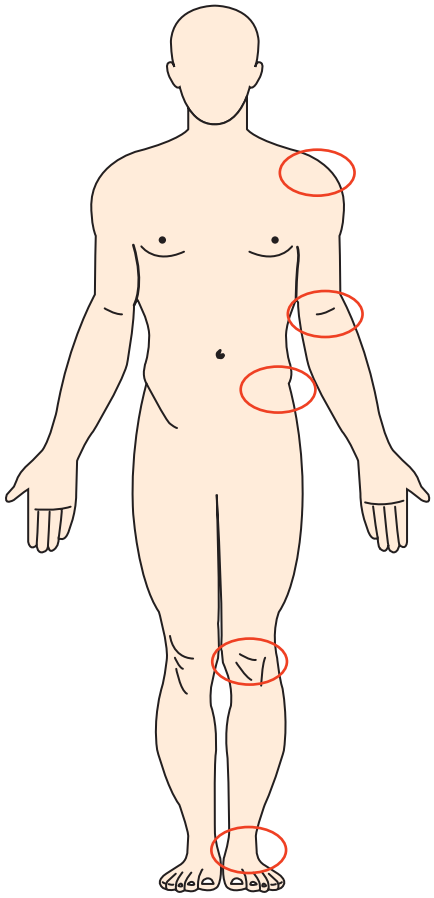


Figura 20-6. Afecciones en la hemartrosis. Las articulaciones afectadas por la hemartrosis en la hemofilia son sobre todo los hombros, los codos, la cadera, la rodilla y los tobillos.

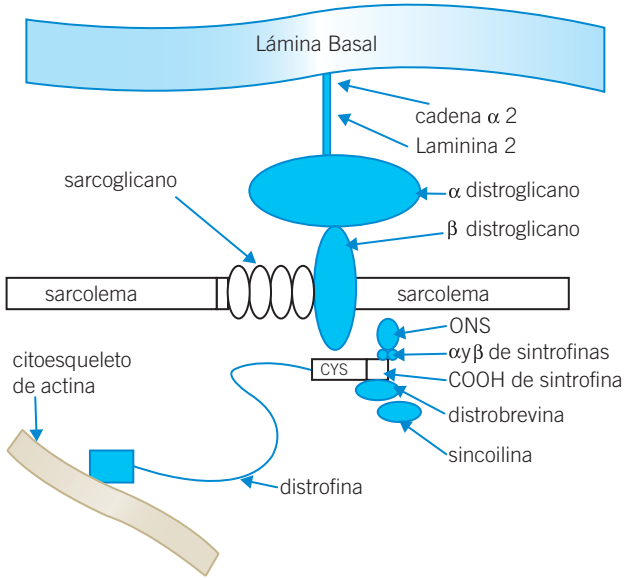


Figura 20-7. Esquema de la posición de la distrofina y su relación con los miembros del complejo distrofina-glicoproteína (DGC). La distrofina actúa como un vínculo entre la lámina basal y la actina del citoesqueleto que ayuda a mantener la integridad del sarcolema. La pérdida de distrofina compromete la DGC y conduce a un sarcolema frágil.

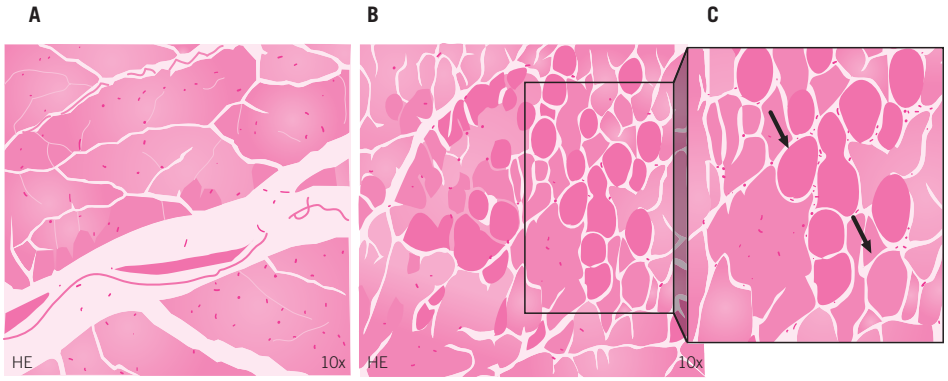


Figura 20-8. Morfología en las fibras musculares en distrofia muscular de Duchenne. Inmunohistoquímica de cortes de tejido muscular de ratón sano **A)** y ratón con modelo de DMD **B)**, donde se muestra la aparición de necrosis **C)**.

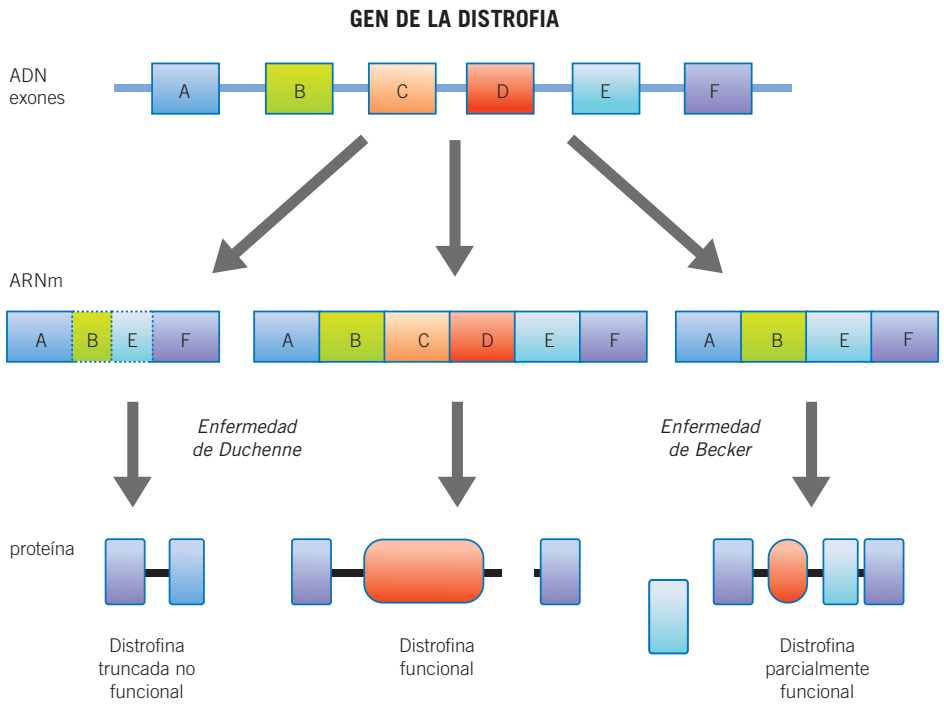
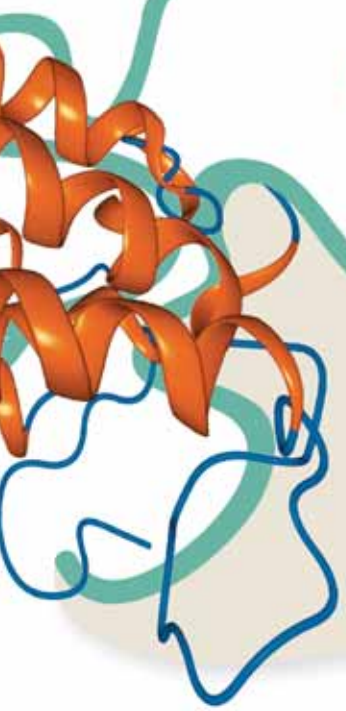


Figura 20-9. Alteración del gen de la distrofina. El gen de la distrofina tiene múltiples exones. Debido a cambios en el marco de lectura abierta se puede producir un ARNm incompleto que produce una proteína truncada no funcional causante de la enfermedad de Duchenne o a una proteína parcialmente funcional que produce la enfermedad de Becker.



Capítulo 21

Bases moleculares del cáncer

Carmen Magdalena Gurrola Díaz

Introducción

El cáncer se caracteriza por ser una enfermedad multifactorial que afecta el crecimiento y la proliferación normal de las células, además de producir alteraciones en el proceso de diferenciación celular, lo que condiciona la formación de un tumor en un tejido específico. Por ello, el término *cáncer* implica, además de un descontrol en el crecimiento y la proliferación celular, una transformación maligna, es decir, una pérdida de las características y funciones normales de las células en un tejido. Estos procesos están influidos por alteraciones genéticas o epigenéticas de numerosos genes que codifican proteínas que regulan este proceso, contribuyendo a un fenotipo maligno. Asimismo, existen factores ambientales implicados en la tumorogénesis con una influencia determinante en algunos tipos de cáncer.

Para una mejor comprensión del control del ciclo celular, éste se puede esquematizar en forma analógica como un *reloj biológico*, el cual opera desde el núcleo de las células en donde existen y/o convergen diversos estímulos que inhiben o inducen la progresión del ciclo celular (figura 21-1).

En las células eucarióticas, el ciclo celular está compuesto de las fases G_1, S, G_2 y M. Su regulación es prioritaria y es controlada por la participación de diferentes proteínas llamadas *ciclinas* y *cinasas dependientes de ciclinas* (*cyclin dependent kinases*, CDK). Ambas actúan cooperativamente, en donde las CDK fosforilan ciertas ciclinas en un momento específico y permiten que la célula continúe el ciclo celular. Además, es importante considerar que entre las fases mencionadas existen puntos de control (*checkpoints*) que involucran una maquinaria compleja de proteínas que verifica si en la célula se dan las condiciones adecuadas o no para continuar con la fase siguiente del ciclo celular. Estos puntos controlan la progresión entre las fases G_1/S, G_2/M y M.

La regulación del ciclo celular involucra a las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (ver el capítulo 2, Ciclo celular), así como a otro tipo de proteínas, que son producto de los protooncogenes y los genes supresores de tumor que, de igual forma, participan de forma orquestada en este control, y cuyas funciones se revisarán a lo largo del capítulo (figura 21-2).

Es evidente la complejidad e importancia del control del ciclo celular, así como la participación múltiple y paralela de varios factores. Esto otorga el carácter multifactorial al cáncer y finalmente complica el restablecimiento de un fenotipo normal en células malignas.

Protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumores

De manera normal, las células responden a señales tanto internas como externas que estimulan la proliferación celular, lo que requiere de una regulación en la que participan diferentes proteínas que estimulan el ciclo celular. Entre los numerosos genes relacionados con la transformación maligna de células se encuentran dos grandes grupos, clasificados como **oncogenes** y **genes supresores de tumores**. Ambos presentan como denominador común su implicación en la proliferación celular.

Oncogenes

En 1910, Peyton Rous, del Instituto Rockefeller y ganador del Premio Nobel, experimentó con sarcoma de pollo. Al inyectar homogeinado de sarcoma libre de células en pollos sanos se inducía la misma clase de tumor, planteando la incógnita de cuál era el agente, molécula o factor responsable de la tumoración.

En las décadas siguientes se descubrió el agente etiológico de este padecimiento: un retrovirus denominado *virus del sarcoma de Rous* (*Rous sarcoma virus*, RSV). En 1970, se describe que uno de los genes del virus del sarcoma

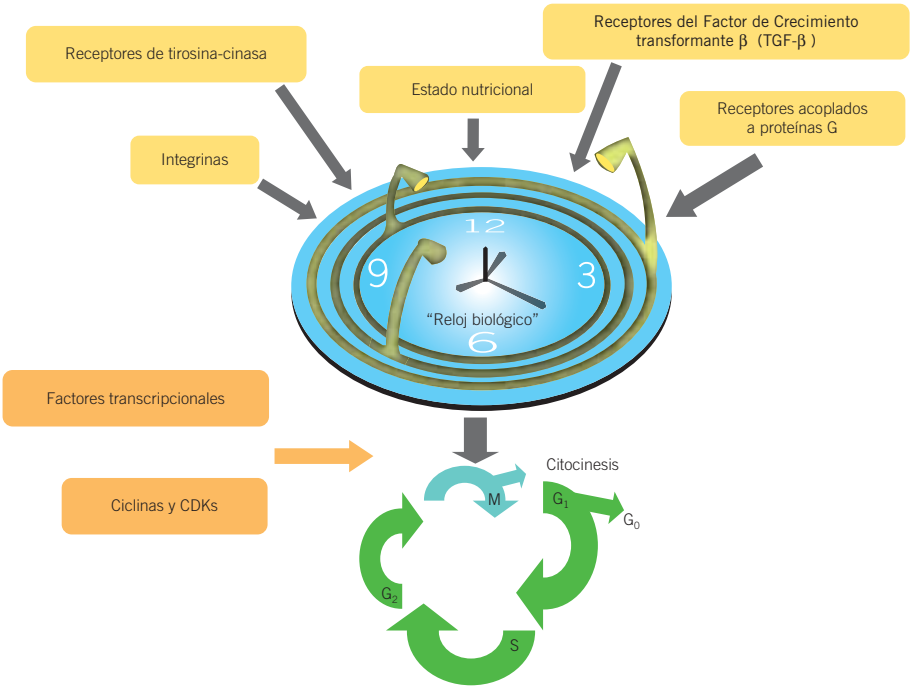


Figura 21-1. Estímulos del ciclo celular. Relación analógica entre el ciclo celular y un "reloj" biológico: su progresión depende de la participación de diversos estímulos.

de Rous, el gen *src*, tiene la capacidad de transformar células normales en fenotipos malignos. El estudio de este gen en experimentos de hibridación *in situ* realizados por J. Michael Bishop y Harold E. Varmus, en la Universidad de California en San Francisco (1976), mostraron que células *normales* de pollo contenían algunos elementos del gen *src*, lo que dio lugar a la siguiente controversia: ¿cómo es posible que genes que se encuentran en el virus oncogénico (RSV) también lo hagan en células eucariotas normales? Estudios posteriores demostraron que versiones similares de genes virales oncogénicos se encuentran en células normales y participan en el proceso de proliferación celular. De hecho, el gen *src* pertenece a una familia cinasas de tirosina que participa en la regulación del desarrollo embrionario y crecimiento celular. Estos genes se denominaron *protooncogenes*, y con este antecedente histórico puede definirse a los **protooncogenes** como genes que codifican proteínas que regulan de manera normal y fisiológica la cascada de eventos que sirven para mantener el control de la progresión del ciclo celular y el estado normal de diferenciación de la célula**.** Se les antepone el prefijo "c" de "celular" para distinguirlos de las versiones virales, a las cuales se les antepone el prefijo "v" (por ejemplo, *c-src* –celular– y *v-src* –viral–). Las **versiones alteradas de** estos **protooncogenes** por mutaciones **dan lugar a los oncogenes.** En consecuencia, las funciones de los productos génicos de los protooncogenes y de los oncogenes son diferentes; en los oncogenes estos productos son las oncoproteínas. Estas proteínas actúan pleiotrópicamente provocando una serie de cambios tanto celulares como moleculares, según el nivel molecular específico en donde actúen.

De igual forma que los oncogenes, son determinantes en la evolución del cáncer. También los **genes supresores de tumores** o ***antioncogenes*** desempeñan un papel clave en la tumorogénesis, ya que operan restringiendo o suprimiendo la proliferación celular bajo ciertas condiciones. Estos genes son sumamente importantes, ya que para la formación tumoral maligna es necesaria su inactivación o pérdida, lo que les confiere una naturaleza *recesiva*. En 1986, se clona el primer gen supresor de tumores el retinoblastoma *(Rb)* y dos años después el gen *p53*, una molécula que por su importancia en el papel fisiológico la revista

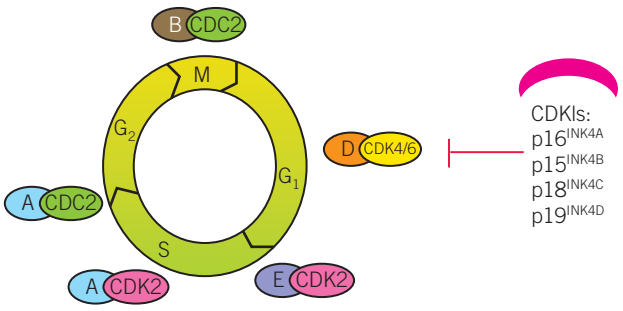


Figura 21-2. Ciclo celular: ciclinas, CDK y CDKI. Existen diferentes complejos de ciclinas/CDK a través de la transición de una fase del ciclo celular a otra. La inhibición de estos complejos se logra por los CDKI.

científica *Science* la denominó "la molécula del año". En la actualidad, los avances en el estudio de los oncogenes y genes supresores de tumores han situado a p53 como el centro de atención del estudio de los procesos cancerígenos.

De esta manera, puede hablarse de genes relacionados con susceptibilidad al cáncer de mama, de un modelo que ha establecido una asociación entre lesiones histopatológicas y las diferentes mutaciones en protooncogenes y genes supresores de tumor, como es el cáncer de colon (**teoría multipasos**), y cómo el virus del papiloma humano es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de cáncer cérvicouterino.

Protooncogenes y genes supresores de tumor de interés biomédico

Para profundizar en la comprensión del concepto de protooncogén es necesario revisar la cascada de eventos que conducen a la división celular.

Proteínas denominadas *factores de crecimiento* proporcionan un estímulo externo a la célula; estas proteínas, al unirse a su receptor en la membrana celular, interiorizan la señal autoactivándose como una enzima con capacidad de tirosina cinasa o a través de segundos mensajeros como puede ser proteínas G, con lo que se inicia una cascada de fosforilaciones en proteínas citoplasmáticas que finalmente modifican factores transcripcionales que se encuentran en el citoplasma y migran hacia el núcleo, uniéndose al DNA y activando la expresión de proteínas que inducen la división celular (figura 21-3A). Asimismo, existen señales inhibitorias que pueden frenar la división celular a través de mecanismos similares (figura 21-3B). Precisamente, el balance entre estas dos cascadas de señales es lo que permite la homeostasis de la división celular en una célula normal, entre otros mecanismos.

Esta cascada de señales es coordinada, entonces, por proteínas desde el espacio extracelular hasta el mismo núcleo, por lo que pueden encontrarse diferentes niveles celulares en donde se controla la división celular, que a continuación se describen brevemente.

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento se unen a dominios extracelulares de receptores enclavados en la membrana plasmática, donde disparan una señal de transducción. El primer oncogén descrito como factor de crecimiento fue *v-sis*, oncogén procedente del virus del sarcoma de los simios, similar a la cadena β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor,* PDGF).

Receptor con actividad de tirosina cinasa

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor,* EGF) es una proteína transmembranal con actividad de tirosina cinasa que se activa cuando se une

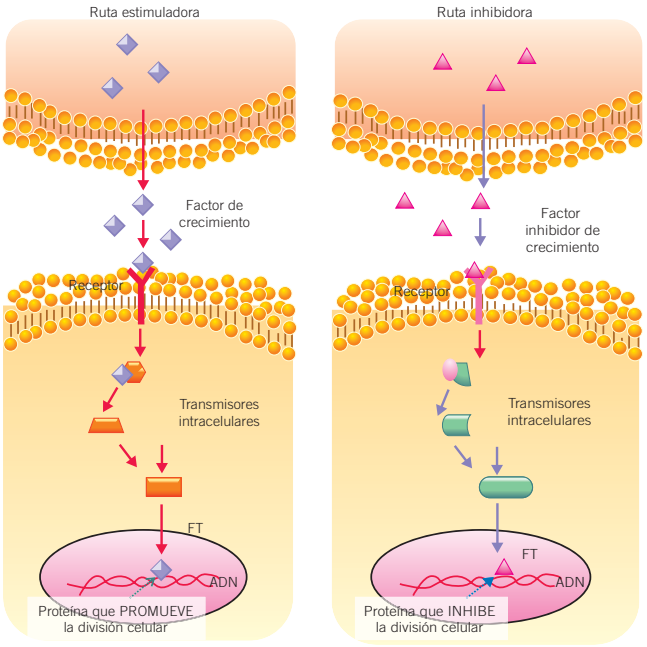


Figura 21-3. Transducción de señales. Ruta de factores que desencadenan vías de señalización que finalmente promueven o inhiben la división celular.

el factor de crecimiento en el dominio extracelular; en consecuencia, la tirosina cinasa de la proteína *v-erb-B* (proteína codificada por el virus de la eritroblastosis aviar) se activa *inespecíficamente sin necesidad de estímulo*; así, pierde su función normal y conduce a la oncogénesis. En forma independiente, otros grupos de investigación identificaron genes relacionados con el gen *v-erb-B* que llamaron HER-2. El receptor al factor de crecimiento epidérmico se encuentra sobreexpresado o mutado en carcinoma pulmonar y, de hecho, es el blanco terapéutico de un grupo de fármacos llamados inhibidores de tirosina cinasa.

Proteínas G asociadas a membrana

Un ejemplo típico de estos protooncogenes implicados en la transducción de señales es la familia de los genes *ras*, que incluye tres protooncogenes estrechamente relacionados, Harvey (ha)-ras, Kirsten (Ki)-ras y N-ras. Éstos codifican para proteínas de ~21 kDa que están en la superficie interna de la membrana plasmática, y su función es unir GTP/GDP a través de su actividad de GTPasa, participando en vías de transducción de señales que regulan el crecimiento celular. Las mutaciones puntuales pueden activar el potencial oncogénico de los genes *ras*, alterando la secuencia aminoacídica de las proteínas p21. *In vivo*, estas mutaciones se encuentran casi exclusivamente en los codones 12, 13 o 61, aunque se han descrito mutaciones puntuales en otros codones (59, 63, 116 y 119), cuyo potencial transformante se ha demostrado por mutagénesis *in vitro*. Entre las vías que activan las proteínas ras se encuentra la vía de seña-

lización de las cinasas MAP (*mitogen-activated-protein*). De manera importante, la identificación de mutaciones en *ras* también contribuye al pronóstico de diferentes tipos de cáncer, entre ellos en cáncer de colon y el pulmonar, ya que la presencia de mutaciones en *ras* puede contribuir a que los tumores metastaticen en fases más tempranas de su evolución, lo que puede servir como un factor pronóstico para los pacientes.

Cinasas citoplasmáticas

La mayoría de la actividad cinasa en mamíferos la lleva a cabo la fosforilación de residuos de serina/treonina. Estas cinasas son proteínas solubles citoplasmáticas y miembros de la cascada de señalización que fosforilan una proteína activándola; ésta, a su vez, fosforila a otra, y así sucesivamente, formando una cascada de fosforilaciones que finalmente culmina en la activación de factores transcripcionales que actúan en el núcleo; esto es, funcionan como segundos mensajeros. El oncogén viral *v-raf* es una versión truncada de la proteína celular. La región reguladora amino terminal tiene una deleción que da como consecuencia una cinasa constitutivamente activa.

Factores transcripcionales

Finalmente, la cascada de señales culmina en la activación de genes relacionados con la división celular, fenómeno que ocurre a través de la activación/inactivación de factores transcripcionales. El gen *c-myc* se ha asociado con diversos neoplasmas en un número amplio de especies, y la alteración en este gen está relacionada con diversos tipos de cáncer, lo cual sugiere que desempeña un papel clave en los procesos biológicos en la proliferación celular. En procesos neoplásicos, el gen *c-myc* actúa por medio de amplificación, es decir, la proteína es normal pero la expresión se encuentra aumentada; en tumores primarios se reportan entre 8 a 10 copias de *c-myc* por célula. Este fenómeno ocurre aun en ausencia de factores de crecimiento. La presencia de múltiples copias de protooncogenes en células tumorales se ha asociado a un mal pronóstico para los pacientes.

Genes supresores de tumores

Como describió Bert Vogelstein, investigador en el área de cáncer de la Universidad Johns-Hopkins, una analogía sencilla que permite ubicar fácilmente los dos principales tipos de genes involucrados en cáncer es que un oncogén se parece al acelerador de un automóvil, mientras que un gen supresor de tumor puede considerarse como el freno. En términos de la célula, cuando una célula se acelera, se divide, y cuando se frena, ocurre lo contrario; por ello, los genes supresores de tumor también se conocen como *antioncogenes*.

Una diferencia entre los oncogenes y los genes supresores de tumor es que los primeros solamente necesitan de un alelo mutado para que se active su función tumorigénica; es decir, poseen carácter dominante. Por el contrario, en los genes supresores de tumor se necesita que ambos alelos del gen estén alterados para que no sean funcionales; esto es, tienen un carácter recesivo. Los mecanismos por los cuales ambos alelos se pueden inactivar pueden ser por el mismo tipo de mutación o por una mutación diferente. Aunque normalmente se poseen dos alelos de un gen sin alteraciones, en algunas ocasiones se puede heredar un gen con uno de sus alelos mutado; sin embargo, el otro alelo tiene la capacidad de reemplazar la pérdida de función del alelo mutado. Cuando se pierde esta combinación por alguno de los mecanismos ya mencionados, que puede incluir una mutación de manera aleatoria, se da una **pérdida de heterocigosidad** de los alelos; esto implica cambios en dos alelos mutados, lo que favorece el desarrollo de un tumor, condición inicial para el desarrollo del cáncer. La pérdida de heterocigosidad está relacionada, por tanto, con la **teoría de los dos golpes** (establecida en 1971 por Alfred G. Knudson), que describe la mayor probabilidad de desarrollar un tipo específico de cáncer en individuos que heredan un alelo mutado y cuyas células son más susceptibles de presentar una mutación somática en el alelo normal. De hecho, el efecto de la teoría de los dos golpes en una célula es el inicio de una proliferación descontrolada que da origen a más células con esta característica; sin embargo, en el cáncer, las células hijas con esta mutación pueden presentar otro tipo de mutación, ya sea en el mismo gen o en otros genes, lo que origina que la proliferación sea aun más rápida o que las células no se diferencien de acuerdo con su estirpe; esto da lugar a lo que se denomina naturaleza clonal del cáncer. Lo anterior pone de manifiesto la complejidad biológica de esta enfermedad.

Entre los genes supresores de tumores mejor caracterizados en el ser humano se incluye el gen de retinoblastoma (*Rb*), localizado en el cromosoma 13 brazo q14.1-q14.2, y el gen *p53*, situado en 17p13.1. Existen otros genes supresores de tumores con una importancia similar, pero se limitan a tipos específicos de cáncer, como los genes *APC* y *DCC*, situados en 5q21-22 y 18q23.3, respectivamente, cuya significación clínica se ha limitado al cáncer de colon. Los genes *NF-1* y *NF-2*, cuyas posiciones en el genoma son 17q11.2 y 22q12.2, se han asociado a neurofibromatosis.

Retinoblastoma

El retinoblastoma es una enfermedad que se manifiesta por una tumoración maligna en la retina desde la infancia. Al estudiar esta enfermedad se observó que el cariotipo de los pacientes con retinoblastoma mostraba una deleción del cromosoma 13, donde se localiza el gen *Rb.* Cabe mencionar que el fenotipo maligno sólo se desarrolla cuando ambos alelos de *Rb* están mutados. En la forma hereditaria de la enfermedad, uno de los alelos de origen parental porta la deleción y cuando se altera el otro alelo (no mutado) se desarrolla el tumor. Se ha reportado hasta 70% de los casos de retinoblastoma con pérdida de heterocigosidad en células somáticas de la retina. Existen también casos esporádi-

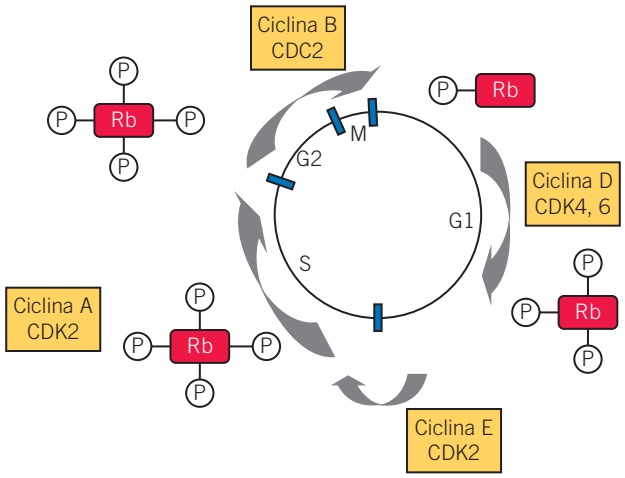


Figura 21-4. Rb y ciclo celular. La progresión del ciclo celular depende del estado de fosforilación de Rb.

cos en que los alelos de origen parental son totalmente normales; sin embargo, el tumor se puede presentar por mutaciones somáticas en los dos alelos. Aunque en la mayoría de los casos el defecto lo causa una deleción, en otros estudios se demuestra que el defecto puede estar en la expresión del gen. La inactivación del gen *Rb* se ha reportado en el retinoblastoma, el osteosarcoma y el cáncer pulmonar de células pequeñas. En el caso de las alteraciones en la expresión génica, se encuentra la metilación del promotor del gen de *Rb* en tumores de cerebro. El gen *Rb* codifica para una fosfoproteína nuclear implicada en la regulación del ciclo celular, a través de su unión cíclica a los complejos ciclina-CDK, específicamente las ciclinas D, E, y al factor transcripcional E2F. Durante el final de la fase G_1 se fosforila y libera al E2F, lo que permite la transcripción. Durante la mitosis este gen sufre una desfosforilación y esta forma hipofosforilada inhibe la proliferación celular (figura 21-4).

P53

El gen *p53* codifica para un factor transcripcional que activa la transcripción de ciertos genes y, en respuesta al daño en el DNA, detiene el ciclo celular. Lo anterior se logra por la inhibición de los complejos de CDK/ciclinas, así como por la fosforilación de Rb. En caso de que el DNA no pueda repararse, las células aumentan sus niveles de p53 y se detienen en la fase G1 antes de entrar a la fase de síntesis, para activar los mecanismos de reparación. Si la lesión no es reparable, la célula es inducida a apoptosis; las células con una lesión reparable retornan a la fase S y a la división celular. El principal objetivo es evitar que la información genética alterada se transmita. Las células premalignas con una mutante de *p53* pueden transmitir esta alteración.

Como sucede con *Rb,* si se heredan mutaciones de los alelos de origen parental existe la tendencia a desarrollar cáncer. Esta patología heredada se conoce como síndrome de Li-Fraumeni y presenta un patrón de herencia autosómico dominante.

En 1987, Donna George y colaboradores reportaron que el oncogén *MDM2* suprime la capacidad de *p53* para inhibir la tumorogénesis. A este respecto, se han reportado amplificaciones de *MDM2* y mutaciones en *p53* en osteosarcomas. Debido a que *p53* está implicado en numerosos tipos de cáncer, se ha propuesto que su detección podría ser útil como un marcador en la evolución de la enfermedad.

Las mutaciones reportadas con más frecuencia en *p53* son puntuales de sentido equivocado (ver el capitulo 8, Mutaciones), que se pueden producir en todo el marco de lectura, en particular de los exones 5 a 8 que constituyen la región central de la proteína. No obstante, cada tipo de cáncer tiene mutaciones particulares más frecuentes en sitios específicos. Por ejemplo, en cáncer de colon se han detectado mutaciones en el codón 165 y en carcinoma hepatocelular, en el codón 249. Las mutaciones puntuales sin sentido suelen asociarse a una prolongación en la vida media de la proteína y, por lo tanto, a un incremento en el nivel basal de la proteína.

Finalmente, la pérdida de la actividad de algún gen supresor de tumor siempre se compensa por la actividad de otro gen que surge como mecanismo de seguridad ante situaciones emergentes de las células. No obstante, estos mecanismos se pierden en la tumorigénesis.

Virus y cáncer

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un tipo de cáncer que tiene como factor de riesgo la infección con el virus del papiloma humano (VPH). Algunos estudios reportan la infección positiva a VPH en pacientes con CaCu en más de 90% de los casos. Cabe mencionar que existen tipos virales de alto riesgo (VPH 16 y 18, entre otros) y de bajo riesgo (VPH 6 y 11, entre otros) al desarrollo de CaCu. Debido a que la infección con VPH se produce en las células epiteliales basales, ésta se mantiene durante el proceso de diferenciación epitelial, para asegurar la síntesis de proteínas virales que darán origen a nuevos virus. En respuesta a la infección, las células activan mecanismos de defensa celular que implican a *p53* y Rb y dirigen a la célula infectada a apoptosis. Los tipos virales de VPH de alto riesgo sobreexpresan las oncoproteínas virales E6 y E7, que inactivan los genes supresores de tumor mencionados. E6 inactiva la función de *p53*, mientras que E7 inactiva a Rb. En ambos casos se produce una pérdida de su actividad, lo que contribuye a la tumorogénesis del CaCu, ya que se producen cambios en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio cervical, y se acumulan alteraciones genéticas en estas células. No obstante, además de la infección viral con algún genotipo de alto riesgo de VPH, es importante considerar la competencia del sistema inmunológico del huésped en la eliminación de la infección viral, ya que no todas las infecciones con VPH de alto riesgo progresan a CaCu; esto pone de

manifiesto la importancia de la respuesta inmune humoral y celular, así como otros factores, entre los que se incluyen infecciones recurrentes, coinfecciones con otros tipos virales y la integración en el DNA celular.

Predisposición genética al cáncer

Los cánceres de tipo familiar implican un riesgo elevado de heredar la enfermedad. El retinoblastoma infantil, en que se hereda un alelo mutado del gen supresor de tumores Rb, es quizá uno de los ejemplos más ilustrativos. En esta afección, más de 80% de los casos desarrollan retinoblastoma entre los 3 y los 4 años de edad. Sin embargo, un pequeño porcentaje de las personas que heredan un alelo Rb mutado no desarrollan un tumor. Esto indica que existe una predisposición al cáncer en determinadas etapas del desarrollo, ya que dichos pacientes pierden la susceptibilidad a la enfermedad si no la desarrollan en los primeros años de la infancia. En los pacientes portadores de una mutación en Rb que no presentaron retinoblastoma en la niñez, desarrollan tumores no oculares en etapas posteriores de la vida. De igual manera, los pacientes afectados con el síndrome de Li-Fraumeni presentan un alto riesgo de desarrollar tumores cerebrales y mamarios, entre otros.

Otro síndrome neoplásico de carácter hereditario relacionado con defectos en genes supresores de tumor es la poliposis adenomatosa familiar (PAF), cuyo patrón de herencia es autosómico dominante. Esta enfermedad representa un modelo de estudio por la correlación que existe entre la evolución de las lesiones histopatológicas en el epitelio colónico y las alteraciones genéticas en genes supresores de tumor (*APC, MCC, DCC, p53*) y oncogenes *(ras)*. Los pacientes con PAF heredan mutaciones en el gen *APC*, que estimula la formación de pólipos que tienden a malignizarse a medida que participan otras alteraciones genéticas en genes supresores de tumores durante la transformación maligna, presentándose lo que se conoce como pérdida de heterocigosidad y **expansión clonal**. La expansión clonal es la capacidad de las células de iniciar, promover y convertirse a un fenotipo maligno por expansión de la clona mutada.

Los diferentes tipos de cáncer son enfermedades complejas, que presentan un carácter multigénico y, en algunos casos, una fuerte influencia del medio ambiente.

Teoría de las mutaciones múltiples

Como se ha mencionado en el desarrollo de este capítulo, la tumorogénesis implica varios eventos en el que obviamente están involucrados tanto oncogenes como genes supresores de tumores, y en la actualidad también se han asociado numerosos genes relacionados con el control del ciclo y la diferenciación celular. Dichos genes participan en diferentes vías de señalización, procesos de evasión de la respuesta inmunológica, apoptosis y angiogénesis, de manera tal que las alteraciones genéticas involucradas en el proceso de malignización de las células se van *acumulando* para finalmente transformar una célula y dar origen a un tumor. Estas mutaciones múltiples, de naturaleza clonal, tienen lugar en diferentes estadios histológicos y se han correlacionado con la evolución, como es el caso del cáncer de colon, uno de los modelos más representativos de esta teoría.

Ejercicios de integración

1. Investigue los procesos moleculares implicados en los puntos de control del ciclo celular.
2. Describa la importancia de la fase S.
3. Investigue qué subfase de la mitosis es crítica como punto de control en la división celular.
4. Mencione los genes cuya expresión es activada por *p53*.
5. Defina pérdida de heterocigosidad.
6. Investigue cuáles son los genes de susceptibilidad involucrados en el cáncer de mama y mediante qué mecanismo participan en la tumorogénesis.
7. Como ejercicio integrador, realice un ensayo donde se mencionen cuáles serían los principales blancos moleculares que regulan en el tratamiento de un tipo de cáncer que usted elija, y qué estrategia farmacológica realizaría para revertir, ya sea parcial o totalmente, el proceso maligno.

Bibliografía

Barbacid M. Ras genes of mammalian cells. *Ann Rev Biochem*, 1987;56:779-827.

Bishop J.M. Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann Rev Biochem*, 1983;52:301-354.

Cavanee K.W., Dryja T.P, Phillips R.A., Benedict WF, Godbout R., Gallie B.L., *et al.* Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 1983;305:779-784.

Cross M, Dexter T.M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*, 1991;64:271-280.

Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell*, 1991;64:249-270.

Jansson A., Gentile M., Sun XF. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. *Int J Cancer*, 2001;92:338-341.

Jones SN, Hancock A.R., Vogel H., Donehower L.A., Bradley A. Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95:15608-15612.

Land H., Parada L.F., Weinberg R.A. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*, 1983;222:771-777.

Lasky T., Magder L. Hepatocellular carcinoma p53 G>T transversions at codon 249: the fingerprint of aflatoxin exposure? *Environ Health Perspect*, 1997;105:392-397.

Lewin B. *Genes X*. Nueva York: Oxford University Press, 2003.

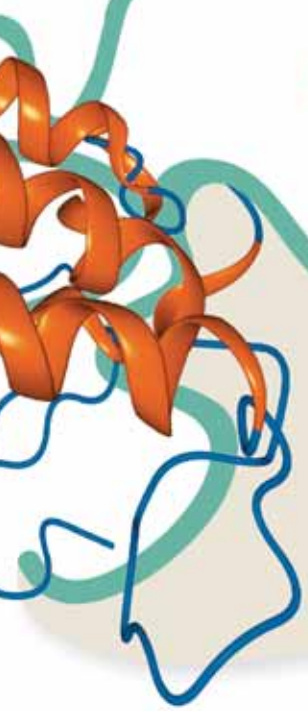
Marx J. Oncogenes reach a milestone. Science, 1994;266:1942-1944.

Rodenhuis S., Slebos R.J., Boot A.J., Evers S.G., Mooi W.J., Wagenaar S.S., *et al.* Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res*, 1988;48:5738-5741.

Smith M.R., Matthews N.T., Jones K.A., Kung H.F. Biological actions of oncogenes. Pharmacol Ther, 1993;58:211-236.

Weinberg R.A. The biology of cancer. *Garland Science*, Taylor and Francis Group, 2007.

Yoshida K., Hamatani K., Koide H., Ikeda H., Nakamura N., Akiyama M., *et al.* Preparation of anti-ras Mr 21,000 protein monoclonal antibodies and immunohistochemical analyses on expression of ras genes in human stomach and thyroid cancers. *Cancer Res*, 1988;48:5503-5509.



Capítulo 22

Bases moleculares de la diabetes mellitus

Ana Rosa Rincón Sánchez / María Cristina Islas Carvajal

Introducción

La diabetes mellitus (DM) se define como una enfermedad endocrinometabólica caracterizada por hiperglucemia crónica, con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, que puede estar producida por una deficiencia en la secreción de insulina, una resistencia a la acción de la misma, o una mezcla de ambas, originada por la destrucción de las células β (beta) de los islotes de Langerhans por un mecanismo autoinmunitario o por una causa desconocida (DM tipo 1, DM1); o bien, por fenómenos de resistencia a la insulina (RI), lo cual ocasiona una dificultad para que esta hormona actúe en los tejidos a causa de trastornos en el número o afinidad de sus receptores (DM tipo 2, DM2).

En el siglo I, el término *diabetes* se empleaba para referirse a la eliminación de grandes cantidades de orina (poliuria). El término fue acuñado por el filósofo griego Arateus que le denominó *diabetes mellitus* o *diabetes sacarina*, debido al olor dulce de la orina, y se suponía que también tenía un sabor dulce como la miel, de ahí su denominación latina: *mellitus*. En los últimos años, se han eliminado los términos *diabetes mellitus insulinodependiente* y *diabetes mellitus no insulinodependiente*, que antes se aplicaban a la diabetes tipos 1 y 2, respectivamente, ya que ambas clases de diabetes pueden necesitar la administración de insulina para su tratamiento.

Epidemiología

La DM en la actualidad se reconoce como una verdadera epidemia. Se estima que en el mundo cerca de 200 millones de personas padecen diabetes y se pronostica que esta cifra se elevará a 300 millones para el año 2025.

La Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) indica que la prevalencia de la diabetes mellitus en América Latina es de 4 a 16%, y se espera un incremento en los próximos 25 años de 25 a 50%. En Estados Unidos, en pacientes jóvenes con obesidad la prevalencia es de 6.6%; de 4% para los individuos de 20 a 60 años; de 12% para los de 60 a 64, y de 17% para los ancianos.

Se espera un incremento en la prevalencia de ambos tipos de diabetes en todo el mundo, aunque es posible que la de la DM2 aumente con más rapidez a causa de la obesidad creciente, la reducción de la actividad física, el envejecimiento de la población y la urbanización de las sociedades.

En México, la DM2 supone la primera causa de muerte y de incapacidad prematura y definitiva, con una prevalencia de 10.9%; además, una de cada cuatro personas desconoce que sufre de la enfermedad y, aun con tratamiento, cerca de 60% no muestra un control óptimo de la glucemia.

Clasificación de la diabetes

La clasificación etiológica más utilizada es la recomendada por la American Diabetes Association (ADA) en 1997 y por el Comité de Expertos para la Clasificación y Diagnóstico de la Diabetes (Organización Mundial de la Salud —OMS—, 1998). Ambas organizaciones clasifican a la DM en:

DM tipo 1. Puede ser de 2 tipos: autoinmune (DM1a) e idiopática (DM1b). Es conocida también como *diabetes juvenil*, pues con frecuencia se presenta durante la infancia, aunque también puede ocurrir en adultos.

DM tipo 2. Puede variar entre la insulinorresistente, con deficiencia relativa de insulina, a un defecto preferentemente secretor con o sin RI. Corresponde a la mayoría (90%) de los casos de diabetes. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con DM2, múltiples factores genéticos y ambientales contribuyen tanto al origen como a la progresión y las complicaciones tardías de la enfermedad.

MODY (*maturity onset diabetes of the young*). Implica defectos genéticos de la función de la célula B pancreática de inicio en la juventud o en la madurez.

DM gestacional. Es aquella que se presenta en el curso del embarazo. Consiste en la presencia de niveles elevados de glucosa en la sangre. Esta condición se desarrolla en cualquier momento durante el embarazo en una mujer sin diabetes.

DM de la infancia. Puede agruparse en varios subtipos principales:

- Diabetes neonatal transitoria o permanente (DMNT y DMNP, respectivamente).
- DM1: DM1a, autoinmune, DM1b, idiopática.
- DM2: este tipo de DM se reporta en niños obesos.
- Diabetes mitocondrial (DMMt).
- Diabetes relacionada con fibrosis quística (DRFQ).
- Diabetes asociada a síndromes como Down y Turner.

Diabetes mellitus tipo 1

Esta enfermedad se caracteriza por la deficiencia absoluta de insulina, ocasionada por un ataque inmunológico en contra de las células beta del páncreas. Los islotes de Langerhans se infiltran con linfocitos T activados y originan *insulitis*. Este ataque autoinmune conduce a un agotamiento gradual de las células beta del páncreas. Los síntomas aparecen en forma súbita cuando se destruye de 80 a 90% de las células beta del páncreas. El páncreas deja de responder en forma adecuada al estímulo de la glucosa para secretar insulina, por lo que ésta debe ser administrada en forma exógena para restaurar el control metabólico y prevenir la cetoacidosis que puede poner en riesgo la vida del paciente. Para que este ataque autoinmune se presente, es necesario la presencia de un estímulo en el ambiente (en algunos casos es por una infección viral), además de un determinante genético que lleve al sistema inmune a no reconocer a las células beta como propias. Las personas con DM1 deben administrarse insulina exógena para poder vivir.

Diabetes mellitus tipo 2

Es una enfermedad crónica con complicaciones que suponen una importante causa de mortalidad y se asocian con el daño o la falla de varios órganos. La RI con hiperinsulinismo está ya presente en el estadio normoglucémico prediabético. Los factores genéticos de susceptibilidad son poligénicos; sin embargo, factores ambientales contribuyen a exacerbar estas anormalidades. Los individuos con DM2 también se caracterizan por una reducción en la masa de células beta del páncreas y aumento en la apoptosis celular.

La DM2 se caracteriza por la presencia de hiperglucemia en ayuno y posprandial. La hiperglucemia en ayuno es resultado de la resistencia hepática a la acción de la insulina. La hiperglucemia posprandial resulta de la secreción anormal de insulina por las células beta del páncreas al consumir alimentos, y de la toma inadecuada de glucosa por los tejidos periféricos sensibles a la insulina, particularmente en el músculo esquelético.

La falta de respuesta de los tejidos receptores a la insulina mantiene el estímulo de la glucemia elevada, lo que se traduce en incremento en la producción y liberación de insulina por las células beta pancreáticas, con el fin de compensar y mantener los niveles normales de glucemia. Este proceso fisiopatológico de hiperglucemia e hiperinsulinemia y alteración funcional de la célula β pancreática puede durar varios años de vida del individuo (hasta 15 años), hasta volverse insostenible para las células beta, por lo que se presenta intolerancia a la glucosa, con elevación exagerada de la glucosa posprandial, RI y, posteriormente, proceso patológico de la DM2.

Las alteraciones metabólicas en la DM2 son más leves que las descritas para la DM1 (cuadro 22-1), en parte porque la secreción parcial de insulina, aunque insuficiente, limita la presencia de cetogénesis. La aparición de la DM2 depende casi por completo de factores genéticos y ambientales, los cuales se consideran factores de riesgo para esta enfermedad, como son:

- Padres o hermanos diabéticos.
- Obesidad e hipertensión.
- Edad superior a 45 años.
- Pertenecer a ciertos grupos étnicos (afroamericanos, nativos americanos, asiáticos, isleños del Pacífico e hispanoamericanos).
- Diabetes gestacional o parto de un bebé con un peso mayor de 4 kg.
- Niveles elevados de triglicéridos en la sangre.
- Niveles elevados de colesterol en la sangre.
- Falta de ejercicio y vida sedentaria.

La ADA recomienda que adultos mayores de 45 años se evalúen para DM2 al menos cada 3 años y con mayor frecuencia en personas de alto riesgo. El criterio diagnóstico de la ADA define la DM como glucemia en ayuno ≥ 126 mg/dl o una glucemia > 200 mg/dl a las 2 horas de una carga de 75 g de glucosa anhidra (cuadro 22-2).

Criterios diagnósticos para la diabetes mellitus tipo 2

Con independencia de la definición, existen diversos criterios para el diagnóstico de la DM constantemente revisados por la ADA y la OMS. Estos criterios se resumen en el cuadro 22-2.

Prueba aleatoria de glucosa

Se sospecha la existencia de diabetes si los niveles son superiores a 200 mg/dl y están acompañados por los síntomas clásicos de aumento de sed, micción y fatiga (esta prueba se debe confirmar con otra de nivel de glucosa en la sangre en ayunas).

Cuadro 22-1. Comparación de las principales características clínicas entre diabetes tipo 1 y 2

Características clínicas	Diabetes tipo 1	Diabetes tipo 2
Edad de inicio	Casi siempre durante la infancia o la pubertad.	Por lo general después de los 35 años de edad.
Tiempo de desarrollo	Se desarrolla con rapidez.	Se desarrolla en forma gradual (crónico).
Estado de nutrición	A menudo se presenta desnutrición.	Casi siempre hay obesidad.
Prevalencia	900 000 = 10% de los diabéticos diagnosticados.	10 millones = 90% de los diabéticos diagnosticados.
Predisposición genética	Moderada.	Muy marcada.
Defecto o deficiencia	Las células beta se destruyen, eliminando la producción de insulina.	Resistencia a la insulina, combinada con la incapacidad de producir cantidades adecuadas de insulina.
Presencia de cetosis	Frecuente.	Rara.
Insulina plasmática	Baja o ausente.	Alta en etapas iniciales, baja en la fase crónica.
Complicaciones	Cetoacidosis.	Coma hiperosmolar.
Empleo de hipoglucemiantes orales	No responde al tratamiento.	Sí responde al tratamiento.
Tratamiento	Siempre será necesaria la aplicación de insulina.	Hipoglucemiantes orales, dieta, ejercicio, y algunas veces insulina.

Prueba de glucosa de ayuno durante por lo menos 8 horas

Se diagnostica diabetes si el resultado es mayor de 126 mg/dl en dos ocasiones. Los niveles entre 100 y 126 mg/dl se denominan alteración de la glucosa en ayunas o prediabetes. Dichos niveles se consideran factores de riesgo para la DM2 y sus complicaciones.

Prueba de tolerancia de glucosa

Inicia con toma de glucosa en ayuno. Después, el paciente toma una cantidad moderada de glucosa en una bebida dulce. La glucosa se mide a intervalos específicos. Se diagnostica diabetes si el nivel de glucosa es superior a 200 mg/dl, luego de 2 horas (esta prueba se usa con más frecuencia para la DM2).

Existen otras pruebas, como la glucosa casual, la glucosa en ayunas, la glucosa posprandial, la curva de tolerancia a la glucosa oral y la hemoglobina glucosilada (GHB). De todas estas pruebas, la GHB o hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) es una excelente medida del control de la glucosa en sangre, sobre todo a largo plazo. La importancia de esta prueba radica en que la HbA_{1c} tiene memoria e indica al médico el control de la glucosa promedio durante los últimos 2-3 meses de prueba.

Cuadro 22-2. Criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), 1997

A. Diabetes
- Síntomas de diabetes + glucemia al azar ≥ 200 mg/dl
- Glucemia ≥ 126 mg/dl en ayuno en 2 días diferentes
- Glucemia 2 horas post SOG ≥ 200 mg/dl en dos pruebas.

B. Alteración de la glucemia en ayuno (AGA):
- Glucemia en ayuno entre 110 y 125 mg/dl
  Si existen factores de riesgo de diabetes hay que realizar una prueba de SOG:
  - Si 2 h ≥ 200 mg/dl = diabetes
  - Si 2 h < 140 mg/dl = no diabético
  - Si 2 h entre 140 y 199 mg/dl = ATG

C. Alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG):
- Glucemia 2 horas SOG entre 140 y 199 mg/dl

SOG, sobrecarga oral de glucosa.

Estadios de la diabetes mellitus tipo 2

Estadio I. Normoglucemia compensada por hiperinsulinemia con diferentes grados de resistencia.
Estadio II. Normoglucemia basal con hiperinsulinismo asociada a disminución de la respuesta de la célula beta pancreática a la glucosa, generando hiperglucemia posprandial.
Estadio III. Disminución de la secreción de insulina con hiperglucemia en ayuno.

Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2

Lograr un buen control metabólico, evitar complicaciones agudas y prevenir las complicaciones crónicas son los objetivos del tratamiento para lograr un automonitoreo y un autocuidado efectivos, junto con un equilibrio emocional adecuado. El tratamiento es muy variable, en función de las características del paciente y el estadio de la enfermedad, pero el esquema general debería incluir desde ejercicio físico y régimen dietético (sin uso de fármacos) hasta estas actividades combinadas con el uso de diferentes tipos de fármacos, administración de insulina y diferentes combinaciones.

Esquema terapéutico general:

1. Después del diagnóstico positivo, se deben ajustar tanto una dieta como una rutina de ejercicio físico.
2. Si las medidas anteriores no funcionan (por lo menos 3 meses), se inicia un tratamiento farmacológico. *En sobrepeso:* la metformina es el fármaco de primera elección. Inhibe la producción hepática de glucosa y mejora la sensibilidad a la insulina, puede combinarse con sulfo-

nilurea (SU), glitazona, secretagogo o inhibidor de alfa-glucosidasa. *En personas de peso normal:* se recomiendan secretagogos para estimular la secreción de insulina. Se pueden usar SU solas o en combinación con metformina, inhibidores de alfa-glucosidasa o glitazona.

3. Si no funciona el tratamiento farmacológico, debe administrarse insulina sola o combinada con los medicamentos mencionados.

Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2

La patogenia de la DM2 sigue siendo enigmática. Sin embargo, queda claro que los hábitos de vida desempeñan un papel crítico, como lo demuestra la obesidad como factor de riesgo. No obstante, se considera que los factores genéticos son incluso más importantes que en la DM1. Estudios en gemelos homocigotos demuestran que la incidencia de DM2 en ellos tiene una concordancia de 60 a 80%. En pacientes con antecedentes familiares de DM2 y en gemelos no homocigotos, el riesgo de desarrollar la enfermedad es de 20 a 40%, mientras que la cifra en población general es de 5 a 7%.

La DM2 es un síndrome heterogéneo que tiene, como elemento común, una hiperglucemia crónica por una deficiencia de insulina o una efectividad de su acción insuficiente. La glucorregulación es un proceso fisiológico complejo, en el cual las fallas a diferentes niveles conducen finalmente a hiperglucemia. En la actualidad, se han identificado defectos en células, tejidos o funciones relacionados con la expresión de la enfermedad, o bien la presencia de polimorfismos. Cada uno de estos cambios en las células aporta su propio riesgo, modificado por los factores ambientales; la sumatoria de estos factores es lo que predispone —en mayor o menor medida— al desarrollo de la enfermedad.

La obesidad es un factor desencadenante de la DM2. Alrededor de 80% de los pacientes con DM2 son obesos; la obesidad abdominal (en oposición a la obesidad en depósitos subcutáneos) es la que presenta un riesgo mayor. La acción lipolítica se opone a los efectos lipogénicos de la insulina y moviliza ácidos grasos para su uso como fuente de combustible durante el ayuno.

Los factores de riesgo propuestos para explicar el incremento de complicaciones e incidencia de enfermedad cardiovascular en la diabetes son la presencia de hiperglucemia, la dislipidemia, la formación acelerada de productos finales de glucosilación avanzada (AGE), como la HbA_{1c}, el incremento del estrés oxidativo y factores genéticos.

Insulina

Función de la insulina

La insulina es una hormona pancreática liberada por las células beta de los islotes de Langerhans en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre, que controla funciones energéticas fundamentales, como el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas. Además, promueve la división y el crecimiento celulares a través de sus efectos mitogénicos.

La insulina es una hormona de 5.8 kDa, y se compone de 51 aminoácidos dispuestos en dos cadenas polipeptídicas A y B, unidas por dos puentes disulfuro (figura 22-1A). La cadena A consta de 21 aminoácidos y la cadena B, de 30. También contiene un puente disulfuro intramolecular entre los residuos 7-7 y 20-19 de aminoácidos de la cadena A y B.

La insulina se libera a la vena porta en respuesta a un aumento de la glucemia, y su principal función es mantener la concentración de glucosa sanguínea en un rango entre 80 y 105 mg/dl, para favorecer la entrada y el almacenamiento de este nutriente en el músculo y el tejido adiposo.

El hígado absorbe alrededor de 50% de la insulina; el resto permanece en la corriente sanguínea, con una vida media de entre 5 y 8 minutos en personas sanas. El resto de la glucosa se almacena en el hígado como glucógeno, lo que inhibe la producción de insulina.

Las acciones de la insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelular, en las cuales la fosforilación inicial del receptor en residuos tirosina (Tyr) lleva a una serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr), que transmiten la señal para la regulación de eventos metabólicos dentro de la célula.

En la figura 22-1B se observa el procesamiento de la insulina en la célula pancreática, en donde el producto final es la insulina y el péptido C.

La función fisiológica de la insulina es regular el nivel de glucosa en sangre. Sin embargo, tras una comida, y en función del índice glucémico, el nivel de insulina sanguínea puede elevarse de manera espectacular. Una comida compuesta en su mayor parte de proteínas, grasa y muy pocos carbohidratos producirá una respuesta glucémica reducida, mientras que una comida rica en monosacáridos (carbohidratos simples, como el azúcar) ocasionará una gran respuesta glucémica.

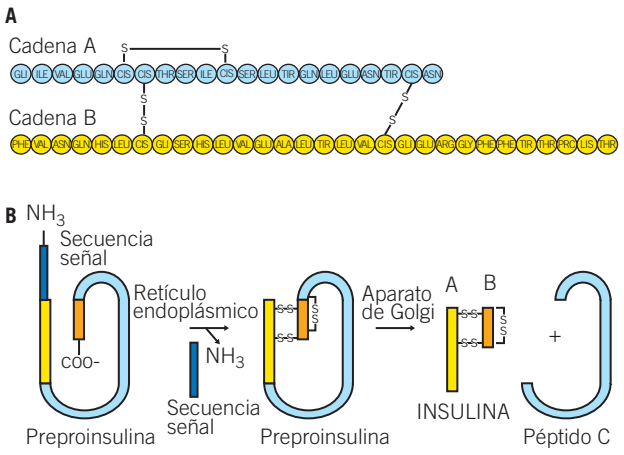


Figura 22-1. Insulina. A) Estructura de la insulina. **B**) Formación de la insulina humana madura a partir de la preproinsulina.

Las comidas habituales pueden elevar la concentración de glucosa en sangre a 140 mg/dl. Las células beta del páncreas son capaces de reconocer el incremento de glucosa y liberar insulina en 30 segundos, y la insulina se une a un transportador de proteína de la sangre que conduce los macronutrientes y los micronutrientes a los miocitos, los hepatocitos y los adipocitos. En los miocitos existen dos transportadores de glucosa: Glut 1 y Glut 4. Se considera que las proteínas Glut 1 son los transportadores básales de la glucosa, porque su presencia en la membrana celular no varía. Sin embargo, las proteínas Glut 4 reciben el nombre de transportadores inducibles de glucosa, pues se desplazan a la superficie de la célula en respuesta a la insulina o a la contracción muscular. El ejercicio físico aumenta el número de proteínas Glut 4 de la membrana celular y, por consiguiente, la sensibilidad a la insulina. Tanto es así, que al introducir la glucosa en esas células, la insulina logra restablecer el nivel de glucosa en la sangre en 2 horas.

Tanto la obesidad como la lipoatrofia ocasionan RI y una predisposición a la DM2, lo que demuestra que el tejido adiposo es crucial para la regulación del metabolismo de los carbohidratos, más allá de su capacidad para captar glucosa. Aunque la insulina no estimula la captación de glucosa en el hígado, bloquea la glucogenólisis y la gluconeogénesis, y estimula la síntesis de glucógeno; de esta manera regula los niveles de glucosa en ayuno. La acción de la insulina en tejidos que normalmente no se consideran sensibles a la insulina, incluyendo el cerebro y las células beta pancreáticas, también son importantes en la homeostasis de glucosa.

Resistencia a la insulina

La RI puede definirse como la incapacidad de las células blanco de responder a la insulina, debido a defectos en su señalización. Esta RI es una de las principales características en las manifestaciones patológicas asociadas con la DM2.

Se han identificado múltiples anormalidades en las reacciones de señalización de la insulina que contribuyen a esta resistencia:

- Reducción del nivel de expresión de receptores de insulina.
- Reducción del nivel de actividad de la tirosina cinasa intrínseca, lo que resulta en una fosforilación del sustrato del receptor de la insulina inadecuada.

Entre las causas potenciales para la disfunción de las células beta del páncreas se encuentran:

- Anormalidades metabólicas reversibles como la *glucotoxicidad* y la *lipotoxicidad*.
- Cambios hormonales como la acción inadecuada de la incretina y la secreción aumentada de glucagón (las hormonas incretinas se producen en el tracto gastrointestinal y se liberan cuando los nutrientes ingresan al intestino y, tras su liberación, se estimula la secreción de insulina; el principal mecanismo regulador para la secreción de glucagón es el nivel de glucosa en sangre).
- Anormalidades genéticas de las proteínas de las células beta del páncreas, como la glucocinasa, el complejo formado por el receptor de las sulfonilureas y el canal de potasio, el factor promotor 1 de la insulina, el factor nuclear de los hepatocitos y el sustrato 1 del receptor de la insulina.
- Reducción de la masa de las células beta del páncreas causada, principalmente, por apoptosis.

La resistencia a la insulina aumenta con el incremento de peso y, por el contrario, se reduce con la disminución. Esto sugiere que la acumulación de grasa es importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina. El tejido adiposo no es tan sólo un órgano que almacena energía, sino que también es un órgano secretor. Las sustancias reguladoras que producen los adipocitos incluyen leptina, resistina y adiponectina, las cuales contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina. Los niveles altos de ácidos grasos que se presentan en la obesidad también participan en el desarrollo de resistencia a la insulina.

El efecto nocivo de los ácidos grasos en la señalización de la insulina se lleva a cabo a través de la activación de diferentes proteínas serina cinasa (JNK, IKK, PKC θ y PKC ζ), que fosforilan al sustrato del receptor de la insulina (IRS) 1 (IRS-1). Por ello, la fosforilación en serinas del IRS-1 desempeña un papel crucial en la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos. Al impedir esta fosforilación se protege el músculo contra la resistencia a la insulina.

Las células adiposas expresan y liberan al factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), factor cuya participación se reconoce en la inducción de la RI. Esta molécula ejerce múltiples efectos sobre la función del adipocito, como inhibición de la lipogénesis y aumento de la lipólisis. El TNFα interfiere en la señalización de insulina y causa resistencia a insulina en la obesidad (figura 22-2).

Señalización de la insulina

La insulina ejerce varios efectos pleiotrópicos en las células: incrementa la replicación y supervivencia celular, disminuye la apoptosis, participa en el ciclo celular y regula la homeostasis del metabolismo energético. La resistencia a la insulina puede deberse a múltiples defectos en la transducción de las señales como, por ejemplo, la activación defectuosa del receptor insulínico y la activación disminuida de la cinasa de fosfatidilinositol trifosfato (PI3K) estimulada por insulina.

Se investigan varias moléculas como estrategia para intervenir en la transducción de señales mediadas por la insulina. Los nuevos enfoques se dirigen a inhibir las vías enzimáticas que desactivan el receptor de insulina, o a sus efectores intracitosólicos subyacentes, como las proteínas IRS. De esta manera, se han podido identificar proteínas de tirosin-fosfatasas específicas (PTP), entre otras, como objetivos terapéuticos.

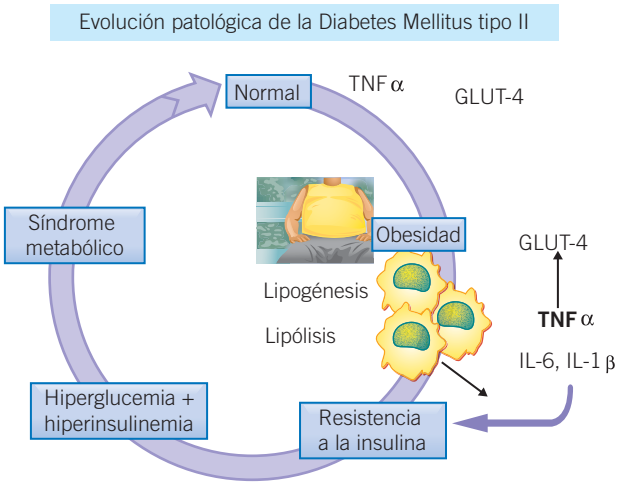


Figura 22-2. Evolución patológica de la diabetes mellitus tipo 2. La TNFα interfiere en la señalización de insulina y causa resistencia a la insulina en individuos con obesidad. En seres humanos obesos se incrementa la actividad de TNFα y puede inducir resistencia a la insulina a través de un defecto en la capacidad del receptor de insulina de fosforilación, o por la disminución en la expresión génica de los transportadores de glucosa Glut 4. TNFα es un estimulante de la lipólisis, mientras que inhibe la lipogénesis.

Receptor de insulina

Una vez en la sangre, la insulina llega a los dos órganos blanco principales: las células del tejido adiposo y las de los músculos; estas últimas son las grandes consumidoras de glucosa. Las células del músculo tienen receptores específicos para la insulina en su superficie.

Las acciones de la insulina inician con su acoplamiento al receptor de insulina (InsR), el cual es una proteína transmembranal heterotetramérica, compuesta de dos subunidades extracelulares alfa y dos subunidades beta transmembranales con actividad tirosina cinasa. La insulina se une a dos sitios asimétricos de las subunidades extracelulares alfa, con lo que se inducen cambios conformacionales que dan lugar a la autofosforilación de las subunidades beta insertadas a través de la membrana y producen la activación de la tirosina cinasa intrínseca del receptor (enzima fosforilante). En ese momento, la porción intracelular del receptor adquiere la capacidad de cinasa, y hace que una molécula de fosfato ($H_3PO_3^-$) se combine con el aminoácido tirosina en cada subunidad, como se describe en la figura 22-3.

La subunidad beta tiene tres sitios de autofosforilación: uno cerca de la membrana; otro dentro del asa de regulación, y el tercero en el extremo carboxilo terminal. La autofosforilación es el inicio de una cascada de respuestas de señalización celular que incluyen la fosforilación de la familia de proteínas IRS, de las cuales se han identificado al menos cuatro, con estructuras químicas similares, pero que se distribuyen en forma distinta en los tejidos corporales. El efecto insulínico se da por la activación de la cadena fosforilativa intracelular, mediante un intercambio de fósforos entre diversas moléculas dentro de la célula. Como consecuencia de la unión de la insulina a las subunidades alfa, la subunidad beta, con propiedades de proteína cinasa, se autofosforila en los residuos de tirosina, serina y treonina. Posteriormente, se inicia una cascada de reacciones de fosforilación y desfosforilación de un gran número de sustratos intracelulares, intermediarios de muchas acciones metabólicas. De este modo, la insulina alcanza sus efectos finales mediante un conjunto de acontecimientos celulares que involucran reacciones muy diversas.

El IRS-1 fosforilado, a su vez, se une a varias proteínas llamadas *proteínas SH2*, que contienen dominios SH2, por homología al dominio 2 de la proteína Src.

Una vez fosforilado, el InsR atrae proteínas adaptadoras que contienen dominios de unión a fosfotirosinas (PTB), como el IRS y la proteína homóloga de Src (Shc). Las proteínas adaptadoras que se unen al receptor fosforilado pueden activar la vía de la proteína cinasa activadora de la mitogénesis (MAPK) o la vía de señalización de la PI3K, como se describe en la figura 22-3.

En la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-cinasa (**PI3K**), las proteínas sustrato del InsR, como la IRS1 e IRS2, se unen a las tirosinas fosforiladas del InsR y se activan de

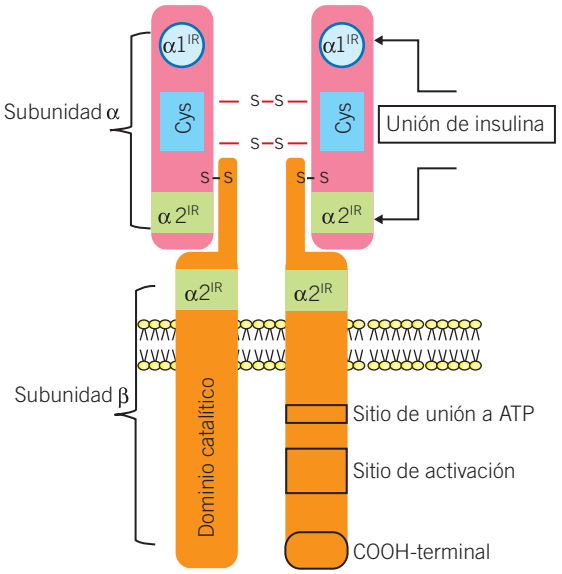


Figura 22-3. Estructura del receptor de insulina: dominios funcionales del receptor. IR es un heterotetrámero con dos subunidades α extracelulares unidas a dos subunidades β por puentes disulfuro. Las subunidades α contienen las regiones de unión a insulina α1IR y α2IR en adición a una región rica en cisteínas (Cys). La subunidad α contiene una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular. En su porción intracelular se localiza un dominio catalítico de cinasa de tirosina con un sitio de unión a ATP y sitios de fosforilación en tirosina que se localizan en las regiones juxtamembranal, sitio de activación y carboxilo terminal. (Tomado de Olivares Reyes J.A., 2008.)

manera que pueden unir el dominio SH2 de la PI3K de la clase IA, que se une a residuos de fosfotirosina en los receptores activados y proteínas adaptadoras.

La unión de PI3K a fosfotirosinas en las proteínas sustrato del InsR permite la liberación de la subunidad p85 de la PI3K que se encuentra inhibida por la subunidad p110 de PI3K. Así, el heterodímero p85-p110 se puede unir a su sustrato fosfatidil inositol -4, 5-bifosfato (PIP2) en la membrana plasmática y producir fosfatidil inositol -3, 4, 5-trifosfato (PIP3), como se muestra en la vía descrita en la figura 22-4. La síntesis de PIP3 lleva al reclutamiento de cinasas de serina/treonina, como Akt (también denominada proteína cinasa B o PKB), la cual se puede unir a lípidos de fosfatidil inositol en las membranas celulares. Akt es miembro de una familia de proteínas (existen tres genes: *Akt1*, *Akt2* y *Akt3*) y se fosforila por PDK1 (complejo proteico mTor/Rictor), en el residuo de treonina 308 y serina 473, que la activan. Akt actúa sobre varias proteínas regulando procesos como la síntesis proteica, el crecimiento y metabolismo celular, la plasticidad neuronal y la apoptosis. Akt también puede actuar sobre la cinasa glucógeno-sintetasa 3 (GSK3) regulando la progresión del ciclo celular.

Sustratos del receptor de insulina

Se han identificado al menos nueve sustratos intracelulares de las cinasas del receptor de insulina/IGF-1. Cuatro de ellos pertenecen a la familia de las proteínas IRS del receptor de insulina. Otros incluyen a las proteínas Gab-1, p60dok, Cbl, APS e isoformas de Shc. Las tirosinas fosforiladas en estos sustratos actúan como zonas de acoplamiento para proteínas que contienen dominios de SH2.

Inhibición de la señalización del receptor de insulina

En adición a la fosforilación de tirosina, tanto el receptor de insulina como las proteínas IRS son susceptibles a las fosforilaciones en sus residuos de serina, que pueden atenuar o abolir la vía de señalización intracitosólica de la insulina, al disminuir o interrumpir la fosforilación de tirosina mediada por la insulina y promover también interacciones con las proteínas 14-3-3. La familia de proteínas 14-3-3 se caracteriza por estar implicada en la transducción de señales mediante su unión a proteínas que contienen fosfoserina. Las proteínas 14-3-3 actúan como moduladoras de la fosforilación. Esto significa que, luego que una proteína es fosforilada, se genera un sitio de unión para 14-3-3, y esta interacción realmente modifica el estado de activación de la proteína (figura 22-5).

Estas fosforilaciones retroalimentan de forma negativa la señalización de insulina, y sirven como mecanismo molecular puente para la comunicación cruzada de otras vías intracitosólicas involucradas en la resistencia a la insulina. En este proceso se han implicado varias cinasas, incluyendo la

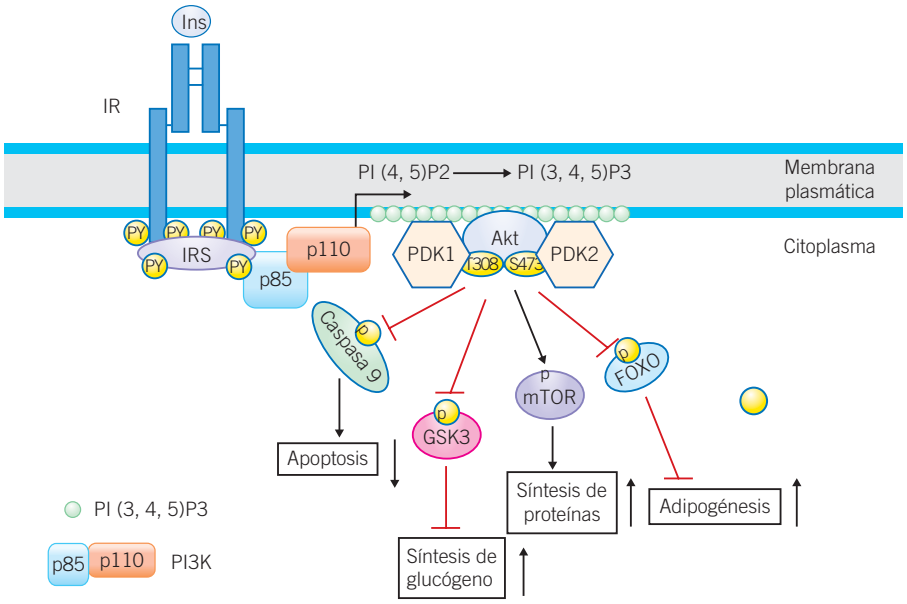


Figura 22-4. Activación de la vía de PI3K/AKT por insulina. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. El IR activo y autofosforilado activa a IRS, que contiene varios sitios de fosforilación en residuos de Tyr (Y) que, al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K. La PI3K posee una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110 y ya activada la p110 tiene acceso a su sustrato PI(4,5)P2, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI(3,4,5)P3, que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, lo que induce una primera fosforilación en la Ser473 seguida de una segunda fosforilación en la Thr308, esta última inducida por PDK1. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9. (Tomado de Olivares Reyes J.A., 2008.)

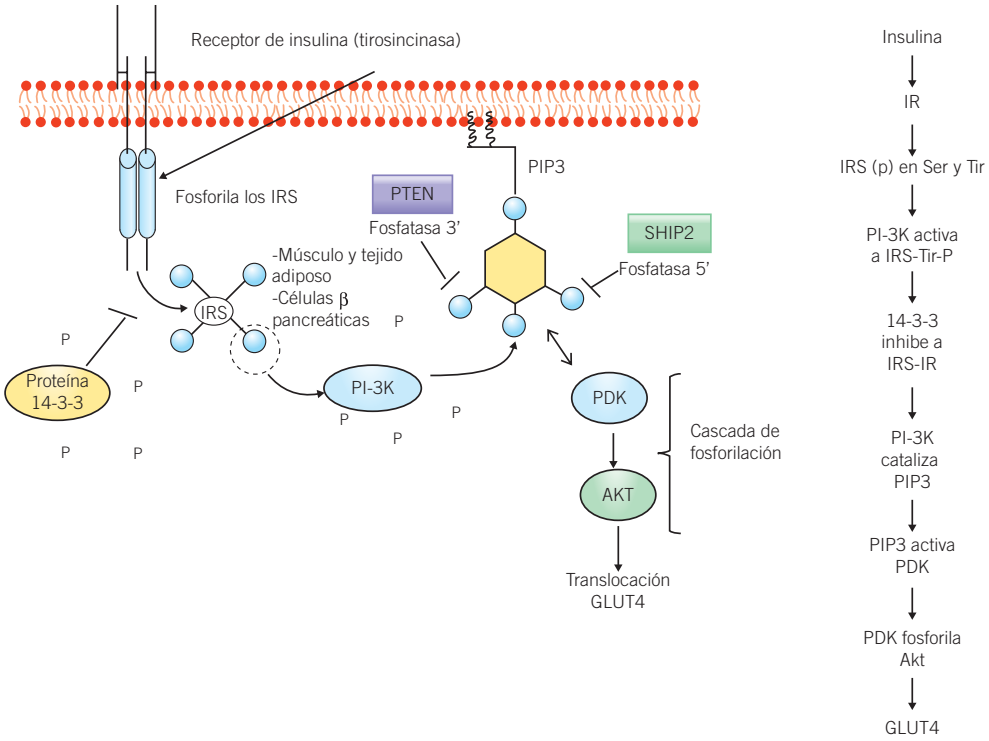


Figura 22-5. Vía AKT y papel de la proteína 14-3-3. La insulina se une a su receptor (IRS) y lo activa. ISR se forforila en Ser y Tir. Cuando el dominio SH2 de PI-3K reconoce a la Tirosina fosforilada el IRS se activa. La proteína 14-3-3 se une al sitio fosforilado de serina e inhibe al IRS-IR. PI-3K activa se transloca y cataliza PIP3 que se une y activa la enzima PDK. PDK foforila la Akt (es una serina/treonina quinasa humana) y la activa y finalmente hace que se trastoque el transportador Glut 4.

PI-3K, Akt, la cinasa glucógeno-sintetasa GSK-3 y el receptor en mamíferos de rapamicina (mTOR, *mammalian target of rapamycin*). Por otro lado, la atenuación de la señalización de insulina inducida por tejido adiposo podría desencadenarse a través de otras vías moleculares y genómicas que ocasionan la activación secuencial de la proteína cinasa C (PKC) y la cinasa del inhibidor del factor nuclear-kappa beta.

La acción de la insulina también es atenuada por proteínas fosfatasas de tirosina (PTPasas), que catalizan una desfosforilación rápida del receptor y sus sustratos.

Cascadas de fosforilación estimuladas por la insulina

Como en otros factores de crecimiento, la insulina estimula la MAPK, para a su vez estimular la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Esta vía involucra la fosforilación de tirosinas en las proteínas IRS y/o Shc, que a su vez interactúan con la proteína adaptadora Grb2, reclutando la proteína de intercambio *Son-of-sevenless* (SOS) hacia la membrana plasmática para activar la proteína Ras. La activación de Ras requiere también la estimulación de la tirosina fosfatasa SHP2, a través de su interacción con sustratos del receptor como Gab-1 o IRS1/2. Una vez activada, la proteína Ras opera como un interruptor molecular, estimulando a su vez una cascada de serinas-cinasas a través de la activación secuencial de las proteínas Raf, MEK y ERK. La activación de ERK la transloca al interior del núcleo en donde cataliza la fosforilación de factores de transcripción, que dan lugar a la proliferación y diferenciación celulares, como se aprecia en la figura 22-6.

Transportadores de difusión facilitada para hexosas

Los *transportadores de difusión facilitada para hexosas* (Glut) son una gran familia de proteínas y sus miembros poseen características comunes con secuencias extremadamente conservadas que determinan estructuras secundarias y terciarias (dominios o *motifs*). Estos dominios les dan especificidad a los transportadores por uno o más carbohidratos, determinan su distribución tisular, la ubicación celular y la regulación de su actividad por hormonas.

En los últimos cuatro años se han identificado nuevos genes que codifican proteínas transportadoras tipo TDFH para la glucosa y que pertenecen a la familia SLC2A (del inglés ***SoLute Carrier 2A***). Sobre la base de la homología de la secuencia primaria, la familia de los Glut puede dividirse en tres subfamilias:

a) **Familia de clase I:** se encuentra formada por los Glut 1, 2, 3 y 4.

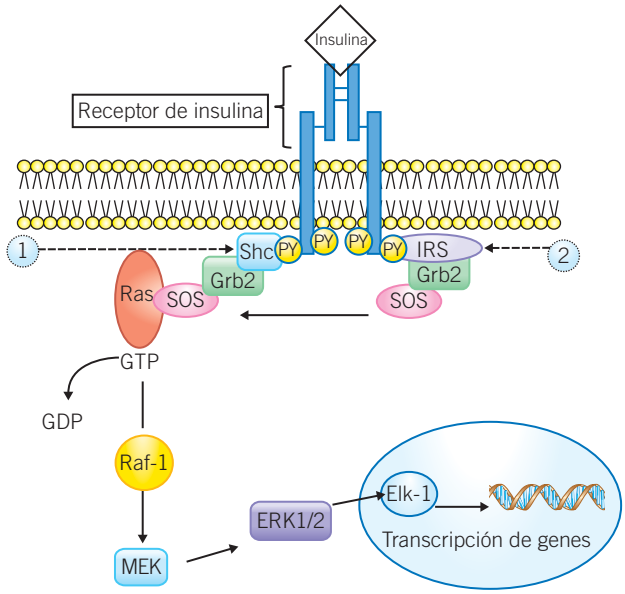


Figura 22-6. Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina. La insulina activa la vía de las MAPK a través de dos mecanismos: en el primero, la activación del IR promueve la asociación de la proteína Shc y ésta une al complejo Grb2/SOS; SOS activa a Ras y una vez activado se inicia el encendido de la cascada de las MAPK. GTP-Ras une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de MEK y de las ERK1/2. Alternativamente, existe una vía independiente de Shc pero dependiente de la activación del IRS por la que la insulina es capaz de activar a las MAPK. En esta vía, una vez que IRS está activo, se une al complejo Grb2/SOS, siguiendo la misma secuencia de activación de proteínas para Shc. (Tomado de Olivares Reyes J.A., 2008.)

b) **Familia de clase II:** constituida por los Glut 5, 7, 9 y 11.
c) **Familia de clase III:** formada por los Glut 6, 8, 10, 12, el Glut 13, o transportador para mioinositol (HMIT -1), y el Glut 14.

Glut 1 (SLC2A1): transportador con alta afinidad

Se encuentra en los tejidos que emplean glucosa como combustible principal. A Glut 1 también se le conoce como transportador de glucosa eritrocito/cerebro. Se encuentra ampliamente distribuido en el ser humano y se expresa en numerosos tejidos fetales y adultos, como los eritrocitos, las células endoteliales, las células nerviosas, la placenta, los glóbulos blancos, las células de la retina, el riñón (mesangio), el tejido adiposo, etc. Glut 1 tiene una alta afinidad por la glucosa (Km* = 1 a 2 mM), por lo que puede transportarla al interior de las células a cualquier concentración de ésta. Se le considera un transportador basal, lo que es importante para el tejido nervioso y el eritrocito (los tejidos donde se encuentra).

Glut 2 (SLC2A2): función glucosensora

Glut 2 es un transportador de glucosa con baja afinidad (Km = 15-20 mM), se expresa en el hígado humano adulto, el riñón, las células beta de los islotes de Langerhans y la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino delgado. Se le atribuye la propiedad de glucosensor porque, con una baja concentración de glucosa en plasma, no es capaz de transportar glucosa al interior de la célula beta y la secreción de insulina es muy baja. En cambio, después de una comida, cuando se incrementa la concentración plasmática de glucosa, el ATP generado por el metabolismo puede estimular la liberación de insulina. Glut 2 es un transportador de tipo bidireccional, que puede transportar glucosa desde la sangre al tejido o bien desde el tejido hacia la sangre, lo que es muy útil para el hígado y el riñón.

Glut 3 (SLC2A3): Glut de más alta afinidad por la glucosa

Glut 3 es un transportador de glucosa de alta afinidad (Km = 1 a 2 mM) que primero fue caracterizado en el cerebro. Es un transportador coagregado con Glut 1 en el tejido nervioso y la placenta. Este transportador participa en el desarrollo embrionario.

Glut 4 (SLC2A4): Glut con gran movilidad

Glut 4 es un transportador de alta afinidad para la glucosa (Km = 5 mM) que se expresa fundamentalmente en el tejido muscular estriado, el tejido muscular cardiaco y el adipocito. Glut 4 representa un mecanismo muy fino de regulación del metabolismo de la glucosa, que sólo permite la entrada de glucosa al tejido muscular cuando es lo suficientemente elevada como para estimular la secreción de insulina que favorecerá la entrada del excedente de glucosa al interior muscular. El mecanismo de Glut 4 es a través de la unión de vesículas con la membrana plasmática figura 22-7**.** Este complicado sistema requiere el concurso de una serie de proteínas de las vesículas y de la membrana, que se denominan en conjunto *proteínas Snare*. La translocación de Glut 4 a la membrana también requiere de la activación de la enzima fosfatidilinisitol-3-cinasa (PI-3K), por intermedio del IRS-1 fosforilado, que forma un complejo con dicha enzima que produce un incremento de su actividad unas 20 veces**.**

Glut 5 (SLC2A5): transportador específico para fructosa

Se expresa fundamentalmente en las células del ribete en el cepillo del intestino delgado, donde media el paso de la fructosa desde el lumen hasta la célula epitelial intestinal

* Nota: Km = constante de afinidad: expresa la relación de afinidad que tiene una enzima y su sustrato. El valor de esta constante es inversamente proporcional a la afinidad de la enzima por el sustrato.

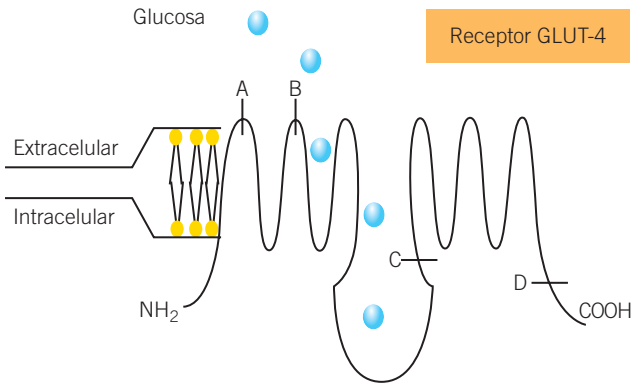


Figura 22-7. Activación de Glut 4. La glucosa ingresa a la célula en cuatro etapas: **1)** se une al transportador en la cara externa de la membrana; **2)** el transportador cambia de conformación y la glucosa y su sitio de unión quedan localizados en la cara interna de la membrana; **3)** el transportador libera la glucosa al citoplasma, y **4)** el transportador libre cambia nuevamente de conformación, expone el sitio de unión a la glucosa en la cara externa y retorna a su estado inicial.

(Km = 10 a 13 mM). Niveles bajos de este transportador también se encuentran en los eritrocitos, el riñón, los espermatozoides, el músculo esquelético y el tejido adiposo de humanos y ratas.

Glut 6 (SLC2A6): Glut 6 de baja afinidad, como en el caso del Glut 23

La proteína más similar Glut 6 es el transportador Glut 8 (44.8% de homología).

Glut 7 (SLC2A7): un número fallido

Después de analizar las secuencias de Glut 7 de ratas, se concluyó que ni los hepatocitos de rata ni los de humanos contenían el ARNm equivalente al que se clonó en los experimentos iniciales, por lo que se infiere que el hallazgo inicial de Glut 7 fue un artefacto de las técnicas de clonaje usadas en la época. Más adelante se detectó un gen con características similares a la de los Glut adyacentes al gen de Glut 5, con el cual tiene gran similitud (58% de homología). Este gen se ha denominado provisionalmente SLC2A7, aunque aún no se conoce el patrón de expresión de este gen ni la especificidad de su tránscrito por sustratos.

Glut 8 (SLC2A8): se inicia la carrera por descubrir nuevos Glut

Al encontrar niveles muy bajos de ARNm de las isoformas conocidas de estos transportadores, surge la idea de la existencia de nuevos transportadores. Experimentos en ratones que no expresan Glut 4 (*Glut 4 knockout mice*) mostraron que la capacidad de transporte de glucosa en el músculo es casi normal, sin que se observe un incremento compensatorio en la expresión de Glut 1 o 3. Este abordaje llevó a la identificación y la caracterización de Glut 8 y Glut 9 (en la actualidad reclasificado como Glut 6).

Glut 9 (SLC2A9): el verdadero Glut 9

Glut 9 es un transportador perteneciente a la clase II, con una homología de 55% con Glut 5. Se expresa de manera importante en el riñón y el hígado, y a bajos niveles en el intestino delgado, la placenta, el pulmón y los leucocitos.

Glut 10 (SLC2A10): hace pareja con el Glut 2

El Km de Glut 10 es de 0.3 mM. El gen del transportador se localiza en una región asociada fuertemente con posibles diabetogenes. La localización del gen y sus propiedades funcionales sugieren que Glut 10 puede llevar a cabo funciones metabólicas de gran importancia y ser un elemento clave en el desarrollo de la DM2. Este transportador se encuentra en mayor concentración en el hígado (adulto y fetal), así como en el páncreas, el músculo cardiaco, el pulmón, el cerebro (adulto y fetal), el músculo esquelético, la placenta y el riñón.

Glut 11 (SLC2A11): un transportador más de fructosa

Sólo se han conseguido productos del gen de Glut 11 humano en el músculo esquelético y cardiaco; de éste se han descrito 3 tipos de variantes: la primera es causada por la existencia de tres exones de inicio diferentes. A diferencia de Glut 4, la actividad del transporte de glucosa de Glut 11 es inhibida en gran medida por la fructosa, lo que lleva a pensar que éste es un transportador para fructosa con baja afinidad para la glucosa.

Glut 12 (SLC2A12): hermano menor del Glut 4

El ADNc de este Glut codifica para una proteína de 617 aminoácidos que posee las características esenciales de los Glut. El grado de homología de este transportador con Glut 4 es de 29% y con Glut 10 de 40%. Glut 12 presenta un asa extracelular de gran tamaño entre las α hélices transmembrana 9 y 10. El inmunoblot ha puesto en evidencia la expresión de Glut 12 en el músculo esquelético, el tejido adiposo y el intestino delgado. Este hecho ha planteado la hipótesis de que este transportador representa el elusivo segundo sistema de transporte sensible a la insulina que se encuentra en células musculares, ya que su ARNm se ha encontrado en el músculo y en la próstata.

Glut 13 (SLC2A13): transportador de mioinositol dentro de la clasificación de los Glut

Glut 13, o transportador de H^+/inositol, codifica para una proteína transportadora de membrana de 629 aminoácidos con una analogía de 35% con Glut 6 y que se expresa fuertemente en células de la glía y en algunas neuronas, con la capacidad de transportar mioinositol y glucosa cuando se encuentra a una alta concentración. El inositol y sus derivados fosforilados (fosfoinositósidos) tienen una función importante como osmolitos y como segundos mensajeros en la regulación de la exo y la endocitosis de vesículas. La expresión de este transportador en ovocitos de *Xenopus laevis* ha demostrado que la actividad de transporte es casi exclusiva para el mioinositol y algunos de sus isómeros, con una Km de 100 mM. Su expresión preferencial en el sistema nervioso central hace pensar que su principal papel está en la regulación de estos metabolitos en el cerebro.

Glut 14 (SLC2A14): una codificación lejana

Este Glut está codificado unas 10 Mb corriente arriba del gen del Glut 3, con el cual comparte un importante parecido. Hasta ahora se había creído que Glut 14 era un seudogen (como el Glut 6, en sus principios), resultado de la duplicación del gen de Glut 3. El gen de Glut 14 posee dos formas: una corta, que consiste en un tránscrito de 497 aminoácidos, similar al Glut 3 en un 94.5%. La segunda forma, llamada *forma larga,* codifica para una proteína de 520 aminoácidos que difiere de la anterior en el extremo aminoterminal. Sin embargo, en contraste con Glut 3 este transportador se expresa fundamentalmente en los testículos, donde su ARNm se encuentra en una concentración cuatro veces mayor que Glut 3.

Genes de susceptibilidad a diabetes mellitus tipo 1 y 2

La aplicación de técnicas de biología molecular ha avanzado en la búsqueda de marcadores genéticos asociados a diversas enfermedades, para su diagnóstico y tratamiento oportunos.

En contraste con la DM1, en donde se ha encontrado una estrecha relación con los genes del sistema HLA, en la DM2 no ha sido posible establecer un solo gen involucrado con esta enfermedad. Sin embargo, se han descrito varios genes relacionados con esta afección, entre los que destacan los genes que codifican para las proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina, el transporte de la glucosa, la síntesis de glucógeno, la síntesis y absorción de ácidos grasos y la diferenciación de los adipositos (cuadro 22-3).

Formas menos comunes de DM2 como las MODY presentan herencia autosómica dominante (formas mendelianas). Este subtipo de diabetes, generalmente de inicio temprano, al igual que la diabetes de herencia compleja, es genéticamente heterogénea. A la fecha se han descrito seis genes causales de MODY distintos: el gen que codifica para la enzima glucocinasa, regulador importante de la secreción de insulina por el páncreas, y cinco genes más que codifican para factores transcripcionales involucrados en la expresión del gen de la insulina y otros genes pancreáticos, como el factor nuclear de los hepatocitos (HNF) 4 alfa, (HNF-4α), HNF-1α, HNF-1β, IPF-1 y beta2/neuroDl.

Diabetes y actividad física: efecto en glut 4, glucogenólisis y resistencia a la insulina

Los efectos beneficiosos de la actividad física para el tratamiento de la DM2 son reconocidos. En varias investigaciones

Cuadro 22-3. Genes candidatos asociados a diabetes tipo 2.

Gen	Función
CAPN10	Calpaína 10, posee actividad enzimática intracelular tipo cisteína-proteasa. Pertenece al grupo de peptidasas de las calpaínas.
PAR-γ2	Receptor activador de los peroxisomas, proteína nuclear involucrada en las rutas metabólicas de los ácidos grasos.
PPARGC1A	Coactivador 1 del PPARG. Proteína que funciona como receptor nuclear y cofactor transcripcional. Está involucrado en la diferenciación del adipocito, en la gluconeogénesis, en la oxidación de los ácidos grasos y en la termorregulación.
UCP-1	Proteínas desacopladoras, participa en el transporte de protones.
UCP-2	Participa en la unión y el transporte de protones. Se relaciona con el desarrollo de la obesidad.
UCP-3	Está involucrado en el metabolismo de los lípidos y el intercambio de gases durante la respiración; también participa en el transporte de protones.
IRS-1	Sustrato del receptor de la insulina. Proteína citoplasmática que al unirse al receptor de la insulina activa la vía de señalización de la glucosa.
SUR1	Receptor de la sulfonilurea. SUR-1 Cassette que une ATP. Algunas mutaciones se han asociado con DM2.
Grelina	Ligando endógeno que regula la secreción de la hormona de crecimiento (GH). Participa en la señalización célula/célula acoplado a proteínas G.
Adipo	Hormona secretada por los adipocitos que regula la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de los lípidos.

se ha demostrado que el ejercicio aeróbico es una forma muy conveniente de entrenamiento, aunque hoy en día en pacientes con DM2, también se recomienda el ejercicio de sobrecarga como un componente importante de los programas de acondicionamiento físico.

En los miocitos, existen dos transportadores de glucosa, Glut 1 y Glut 4. Se considera a las proteínas Glut 1 los transportadores basales de la glucosa, porque su presencia en la membrana celular no varía. En otras palabras, las células musculares poseen un número determinado de proteínas Glut 1 en la membrana celular para transportar glucosa. Sin embargo, los transportadores Glut 4 se desplazan a la superficie de la célula en respuesta a la insulina o a la contracción muscular inducida por la actividad física (figura 22-8). Así, el ejercicio físico aumenta el número de proteínas Glut 4 en la membrana celular y, por consiguiente, la sensibilidad a la insulina, ya que es translocado hacia la membrana de la célula muscular, sin intervención de la insulina. Una simple caminata permite la entrada de 100 g de glucosa/hora a los músculos; mientras que el ejercicio intenso permite la entrada, como máximo, de 200 g de glucosa/hora.

AMPK y consumo de glucosa del músculo

La proteína cinasa activada por AMP (AMPK) es una enzima que se activa cuando se produce un cambio en los depósitos energéticos de la célula, debido a mecanismos de contracción. También se ha visto que cuando el músculo se ejercita se activa por hipoxia. Su papel crucial en el consumo de glucosa se ha demostrado fisiológica y farmacológicamente. Este mecanismo, observado *in vitro*, se presenta de manera independiente de los mecanismos inducidos por la insulina. En la medida que AMPK activa el consumo de glucosa en el músculo, los niveles de glucosa sanguínea descienden. La magnitud de este fenómeno es dependiente del contenido de glucógeno muscular, del grado de entrenamiento del músculo y del tipo de fibras musculares que lo componen. Otro fenómeno implicado en el consumo de glucosa por AMPK es la acción de ésta sobre la sensibilidad del receptor de insulina, asociada a la disminución de triglicéridos (TG) intracelulares. Dichos TG entorpecen la señalización de insulina y junto con la disminución de Malonil CoA están implicados en la patogenia de la RI.

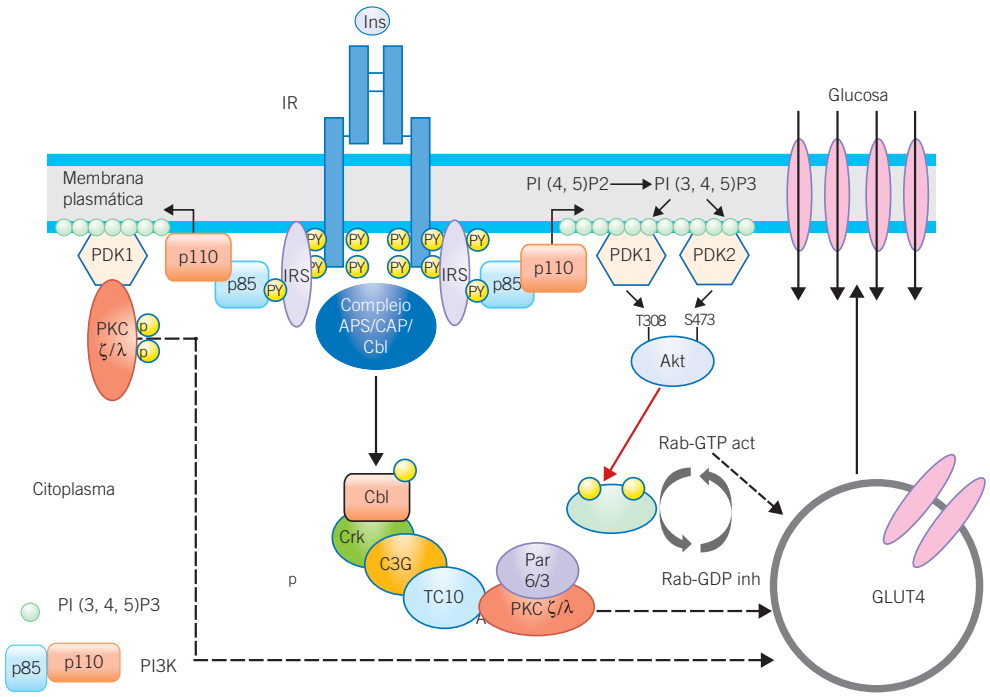


Figura 22-8. Regulación del transporte de glucosa por insulina. La insulina promueve la translocación del transportador Glut 4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática. La proteína AS160 en su estado no fosforilado y activo regula negativamente a la proteína G pequeña Rab, la cual participa en el tráfico vesicular de Glut 4. AS160 estimula la hidrólisis del GTP unido a las Rab (generando Rab-GDP, inactivo) e inhibiendo el tráfico vesicular. Cuando la AS160 es fosforilada por Akt se inhibe, lo que incrementa el tráfico-dependiente de Rab-GTP (activo) de Glut 4 a la membrana plasmática. Por otra parte, PDK1 induce también la fosforilación de sitios críticos en el asa de activación de dos formas atípicas de la PKC (PKCë/î), que contribuyen de gran manera a la translocación de Glut 4 inducida por insulina. Recientemente, se describió una vía alternativa independiente de PI3K/PDK1/Akt, en donde la unión de insulina a su receptor activa a la proteína G pequeña TC10 vía el complejo APS/CAP/Cbl. Es así que TC10 participa en la activación de las PKCë/î que produce la translocación de Glut 4. (Tomado de Olivares Reyes J.A., 2008.)

El AMPK también estimula la translocación de los transportadores de glucosa, Glut 4. La presencia de óxido nítrico estimula el AMPK, y éste, a su vez, el metabolismo de glucosa.

Señales hacia el transporte de glucosa durante el ejercicio

El ejercicio induce, de manera independiente del mecanismo de la insulina, la incorporación y el consumo de glucosa por parte del músculo. Al parecer, uno de los mecanismos esenciales está mediado por las variaciones en las concentraciones del Ca^{2+} por medio de la activación de la PKC que involucra al AMPK y otras proteínas que corresponden a la cascada de señales de insulina, como la p38 y la familia de las MAPK.

Durante el consumo de glucosa por parte del músculo, están involucrados los procesos de aumento del aporte de glucosa a la membrana celular, debido al incremento de la capilaridad y perfusión que supone el ejercicio, y seguidamente por una mayor capacidad de transporte de la membrana obtenida por la vía de translocación de los Glut 4 y por los microtúbulos que los trasladan desde el espacio intracelular a la membrana. En la contracción repetida del músculo se incorporan diacilgliceroles, que inhiben la cascada de señales de insulina y, por lo tanto, funcionan como proteínas moderadoras de la entrada de glucosa al citoplasma celular.

Aspectos ligados al entrenamiento físico

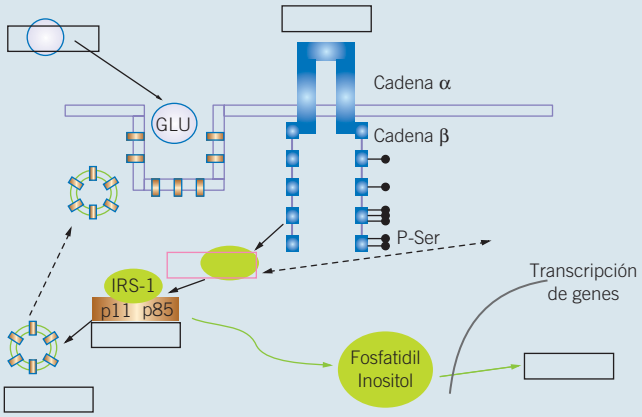
El entrenamiento físico incrementa la posibilidad de metabolizar u oxidar ácidos grasos, gracias al aumento de la capilaridad que posee el tejido muscular entrenado. Éste es capaz de modificar el umbral oxidativo y, ante una misma carga, el músculo entrenado puede cambiar la proporción oxidativa de grasas y glucógeno. Por otro lado, se ha observado que el exceso de glucosa plasmática, acompañado de elevaciones de insulina, inhibe la oxidación de ácidos grasos en el músculo. Este efecto no sucede a la inversa, es decir, ante un aumento de ácidos grasos circulantes no aumenta la capacidad oxidativa de grasas por parte del músculo durante el ejercicio**.** Esto es muy importante ante los diferentes estados fisiopatológicos relacionados con la RI.

Ejercicios de integración

1. Complete el siguiente cuadro de clasificación de los tipos de DM con la información contenida en el capítulo.

	Diabetes tipo 1	Diabetes tipo 2	Diabetes MODY	Diabetes gestacional
Prevalencia en México				
Enfermedad/Estado desencadenante				
Edad de inicio				
Genes asociados				
Defecto en la señalización de insulina				
Niveles de insulina plasmática				
Complicaciones				
Tratamiento				

2. Complete el siguiente esquema de la señalización de insulina, rellenando los cuadros con los nombres de las moléculas:



Bibliografía

Aguilar-Salinas C.A., Velazquez Monroy O., Gómez-Pérez F.J., González Chavez A., Esqueda A.L., Molina Cuevas V., *et al.* Characteristics of the patients with type 2 diabetes in Mexico: results from a large population-based, nationwide survey. *Diabetes Care,* 2003;26:2021-2026.

American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care,* 1997;21(Suppl 1):S5-S16.

Bolen S., Feldman L., Vassy J., Wilson L., Yeh H.C., Marinopoulos S, *et al.* Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med,* 2007;147(6):386-399.

Canizales-Quinteros S., Huertas-Vázquez A., Riba-Ramírez L., Monroy-Guzmán A., Domínguez-López A., Romero-Hidalgo S., *et al.* Identificación de distintos loci de susceptibilidad relacionados al desarrollo de diabetes de inicio temprano y enfermedad cardiovascular en familias mexicanas. *Gac Méd Méx.* 2005;141(2):115-122.

Cruz M., García-Mena J., López-Orduña E., Valladares A., Sánchez R., Wacher-Rodarte N., *et al.* Genes candidatos como posibles marcadores de susceptibilidad a diabetes tipo 2. *REB,* 2005;24(3,4):81-86.

Inzucchi S.E. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *JAMA,* 2002;287(3):360-372.

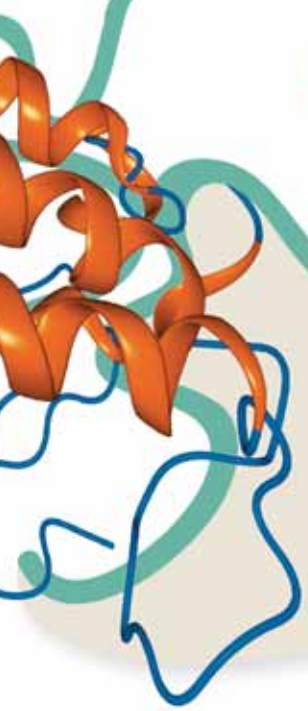
NICE. *Clinical Guideline. Management of type 2 diabetes: Management of blood glucose.* Londres: National Institute for Clinical Excellence; 2002.

Olaiz-Fernández G., Rojas R., Aguilar-Salinas C.A., Rauda J., Villalpando S. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud Pública Mex, 2007;*49(Supl 3):S331-S337.

Olivares Reyes J.A., Arellano Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB,* 2008;27(1):9-18.

Plum L., Belgardt B.F., Brüning J.C. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest,* 2006;116(7):1761-1766.

U.K., Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet,* 1998;352(9131):837-853.



Capítulo 23

Bases moleculares de la obesidad

Blanca Estela Bastidas Ramírez / Angélica Sofía González Garibay
Alfonso López Vázquez / Viviana Carolina Núñez Valdez

Introducción

Durante las últimas décadas la obesidad se ha convertido en una enfermedad con una alta prevalencia a escala nacional y mundial. A 2012, México ocupa el primer lugar de obesidad en adultos y el segundo en obesidad infantil. La obesidad aumenta seis veces el riesgo de padecer enfermedades crónicodegenerativas no transmisibles, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), enfermedad cardiovascular (ECV) y enfermedad cerebrovascular. En la actualidad, estas tres enfermedades constituyen las principales causas de mortalidad en México.

Hasta hoy, los avances científicos y tecnológicos han brindado una respuesta incompleta de la etiología de la obesidad. Es evidente que los factores genéticos y ambientales, como una dieta incorrecta y la inactividad física, participan en el desarrollo de esta enfermedad. Es fundamental comprender los mecanismos moleculares que regulan el hambre e inducen la ingesta de alimentos, así como de los mecanismos de las señales de saciedad, para encontrar alternativas en la prevención y el tratamiento de la obesidad.

Obesidad

Definición

La obesidad es una enfermedad crónica degenerativa multifactorial caracterizada por un aumento desproporcionado de tejido adiposo, o adiposidad, en el organismo, que se asocia con el deterioro de la salud. Este aumento de tejido adiposo se debe al balance energético positivo resultado del desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético.

Diagnóstico de obesidad

El índice de masa corporal (IMC) es una estimación indirecta para diagnosticar la obesidad y fue ideado por el estadista L. A. J. Quetelet, por lo que el IMC también se conoce como índice Quetelet. El IMC es la relación resultante de dividir el peso corporal en kilogramos (kg) entre la talla en metros al cuadrado (m^2):

$$\text{IMC} = \text{peso en kg} / \text{talla en m}^2$$

Con base en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que un IMC igual o mayor de 30 kg/m^2 corresponde a obesidad (cuadro 23-1). Asimismo, un valor de IMC igual o mayor a 25 kg/m^2 aumenta las probabilidades de desarrollar enfermedades asociadas con la obesidad. Se estima que la herencia en la variación del IMC está en el rango de 0.4 a 0.7; es decir, la probabilidad de heredar la obesidad es muy baja y está más asociada a factores exógenos.

Comorbilidades de la obesidad

La obesidad es un factor de riesgo para desarrollar resistencia a la insulina (RI), DM2, ECV, accidente cerebrovascular, osteoartritis, cáncer del endometrio, cáncer de mama y cáncer de colon, entre otras afecciones crónicas no transmisibles asociadas. Además, la obesidad también está vinculada a varias enfermedades digestivas, que incluyen la enfermedad por reflujo gastroesofágico, la esofagitis erosiva, pólipos colorrectales y la esteatohepatitis no alcohólica. La obesidad y el sobrepeso están asociados a 44% de los casos de DM2, 23% de los casos de cardiopatías isquémicas y 7 a 41% de los casos de cáncer.

Tejido adiposo

El tejido adiposo, o tejido graso, es de origen mesenquimal y representa un tipo de tejido conjuntivo. Está conformado por adipocitos que acumulan triglicéridos en su citoplasma. Estos adipocitos tienen dos funciones primordiales: reserva de energía y termogénesis. Sin embargo, al tejido adiposo se

Cuadro 23-1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los valores del IMC para el diagnóstico de la obesidad.

IMC NOM (kg/m^2)	IMC OMS (kg/m^2)	Clasificación
	Menor de 18.5	Peso bajo
	18.5 a 24.9	Normal
	25 a 29.9*	Sobrepeso
	30 a 34.9**	Obesidad nivel I
	35 a 39.9	Obesidad nivel II
	Mayor a 40	Obesidad nivel III mórbida

*En población mexicana el sobrepeso se diagnostica con valores de IMC ≥ 25; pero < 27, así como IMC > 23 en población de talla baja.
**En población mexicana se diagnostica obesidad si el valor de IMC es ≥ 27 y en población de talla baja si el IMC > 25.

le reconoce actualmente como un órgano endocrino, debido a que no sólo responde a sistemas tradicionales de hormonas y al sistema nervioso central (SNC), sino que expresa y secreta diversas proteínas con funciones endocrinas. Entre éstas se encuentran la adiponectina, la leptina, la resistina, diversas citocinas, componentes del complemento, el factor inhibidor del activador de plasminógeno-1 y proteínas del sistema renina-angiotensina. Por tanto, el conocimiento de la función de estas moléculas contribuirá a comprender el complejo desarrollo de la obesidad.

En el adulto, el balance energético positivo ocasiona un aumento en el tamaño del adipocito, fenómeno conocido como *hipertrofia*, mientras que en niños y adolescentes predomina el aumento en el número de adipocitos, lo que se conoce como *hiperplasia*. La hipertrofia del adipocito ocasiona modificaciones en su expresión génica, de tal manera que aumenta la síntesis del factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), una citocina proinflamatoria sintetizada principalmente por los macrófagos. El TNFα, a su vez, aumenta la secreción de la citocina proinflamatoria llamada interleucina 6 (IL6). De esta manera, el TNFα, junto con la proteína de unión al retinol sérico y la proteína C reactiva, se consideran marcadores de inflamación en obesidad.

Otro de los cambios en la expresión génica es la alteración de la síntesis de proteínas como la adiponectina, la leptina y la resistina.

Proteínas del tejido adiposo

Adiponectina

El gen de la adiponectina, o *ADIPOQ*, también conocido como *ACDC*, *ACRP30*, *APM1* o *GBP28*, se localiza en el cromosoma 3q27 y se expresa principalmente en el tejido adiposo blanco. La adiponectina es una hormona constituida por 244 aminoácidos que contiene un péptido señal, el cual permite su secreción al exterior del adipocito. La adiponectina se modifica de forma postraduccional mediante hidroxilación y glucosilación. Debido a estas modificaciones, es capaz de conformar trímeros, hexámeros e isoformas de alto peso molecular. Existe una relación inversa entre los niveles circulantes de adiponectina y la cantidad de masa grasa presente en un organismo o su IMC.

En un estudio longitudinal en adultos se sugirió que la concentración baja de adiponectina en plasma es un factor de riesgo para presentar DM2. Este argumento se basó en que los sujetos que desarrollaron DM2 presentaban concentraciones 22% más bajas que quienes no la desarrollaron. Sin embargo, en este mismo estudio se encontró un grupo de sujetos con obesidad de nivel II que tenían un rango fisiológico de adiponectina plasmática y no desarrollaron comorbilidades metabólicas.

En modelos de ratones tratados con adiponectina se ha encontrado que ésta es un factor protector de RI en mayor grado en los ratones obesos que en los que presentan un peso normal. Un estudio realizado en niños mexicanos demostró que la adiponectina tiene una fuerte asociación inversa con la edad, el IMC y las concentraciones de insulina. Además, la adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina, inhibe la gluconeogénesis en el hígado, inhibe la expresión de moléculas de adhesión, bloquea la migración de macrófagos, evita la formación de células espumosas, reduce la producción de células B, disminuye la respuesta de las células T y favorece la translocación de los transportadores de glucosa.

Leptina

El gen de leptina (del griego *leptos*, delgado), se descubrió en 1994 en el ratón. En el ser humano se localiza en el cromosoma 7q31.3 y se le ha denominado gen *LEP*, pero también se le conoce como gen *OB* o gen de la delgadez. El gen *OB* codifica una proteína no glucosilada, con carácter de hormona, de 167 aminoácidos, con una secuencia señal de 21 aminoácidos, que se elimina antes de que la leptina se transporte al torrente circulatorio como una proteína de 146 aminoácidos. En su forma activa, contiene una unión disulfuro intercadena, la cual es importante para que la proteína ejerza su actividad biológica. La leptina presenta una alta homología entre las diversas especies y equivale a 84% en el ratón y 83% en la rata. Se expresa principalmente en tejido adiposo y los niveles circulantes son directamente proporcionales a la masa grasa.

Entre las funciones de la leptina destacan la disminución de la ingesta de alimento, el aumento del gasto energético, la estimulación de la lipólisis y la mejoría de la sensibilidad a la insulina. El aumento de la masa grasa se correlaciona con el aumento en la síntesis de leptina. Por ello, los niveles de leptina se han relacionado con obesidad, DM2 y RI.

En modelos animales se ha observado que, al recibir una dieta alta en grasa, aumentan los niveles plasmáticos de leptina. La leptina atraviesa la barrera hematoencefálica mediante un sistema de transporte saturable, de tal manera que, aunque los niveles de leptina sean altos, no toda llegará al SNC. A este hecho se le conoce como *bloqueo leptinérgico* o *resistencia a la leptina* (RL).

En sujetos obesos coexiste la RI y la RL, por lo que se ha postulado que la leptina es la responsable de la relación entre la obesidad y la RI. Los niños y los adolescentes que presentan DM2 y sobrepeso tienen mayor concentración de leptina con respecto a los sanos. La expresión del gen *LEP* disminuye en caso de ayuno prolongado. Otro factor que afecta los niveles de leptina es la pérdida de peso, ya que conduce a una disminución rápida y desproporcionada de leptina. Al parecer, las variaciones en las concentraciones de leptina también dependen del sexo, ya que en mujeres se han encontrado niveles más elevados.

Se ha demostrado que la administración de leptina exógena normaliza la hiperglucemia y la hiperinsulinemia en modelos animales de obesidad genética. La obesidad que se acompaña de RL en humanos es más grave.

Cuando la leptina ingresa al SNC induce la expresión del tránscrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) y de propiomelanocortina (POMC), y éste, a su vez, estimula los receptores de melanocortina 3 (MC3R) y 4 (MC4R); este proceso induce saciedad y bloquea el estímulo del hambre.

Resistina

El gen de la resistina (*RETN*) se localiza en el cromosoma 19p13 y codifica un prepéptido de 108 aminoácidos, con un péptido señal hidrofóbico que es escindido antes de su secreción. La resistina es una hormona cuyo nombre se deriva de su participación en la RI, pertenece a la familia FIZZ (*found in inflammatory zone*), y también es conocida como ADSF (*adipocyte-specific secretory factor*) o FIZZ3. La resistina se expresa en el tejido adiposo visceral y en macrófagos, y se ha demostrado que su expresión aumenta durante la diferenciación de adipositos; al disminuir el tejido adiposo visceral, disminuyen los niveles de resistina en plasma. También se ha demostrado que, en ratones, los niveles de resistina están relacionados con la glucemia. El papel que esta proteína desempeña en humanos es controvertido, ya que no todas las personas con obesidad y DM2 tienen niveles plasmáticos elevados de resistina.

Algunos investigadores apoyan la idea de que los polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) de la resistina están asociados con el desarrollo de obesidad, RI y DM2. Se ha reportado en humanos que el genotipo G de la región promotora -420G incrementa la expresión del gen y aumenta los niveles de resistina en plasma, que se relaciona con el desarrollo de obesidad y RI. Sin embargo, otro grupo de investigadores no encontró correlación entre los niveles de resistina en plasma y los SNP en obesidad o DM2. Lo que sí que se ha comprobado es que la resistina tiene relación estrecha con el entorno inflamatorio, debido a su predominante producción por macrófagos y por su correlación con los niveles de IL6.

Regulación del hambre y la saciedad

Regulación central

Desde hace medio siglo, se conoce de la existencia de diversos mecanismos fisiológicos que intervienen en la regulación homeostática del peso corporal. Uno de estos mecanismos lo lleva a cabo la leptina, que actúa en el SNC. La adiposidad ocasiona el incremento de la síntesis de leptina; la leptina ingresa al SNC hacia el núcleo arqueado y estimula las neuronas productoras de POMC y CART, y al mismo tiempo la leptina actúa sobre neuronas que sintetizan neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada a Agouti (AgRP), bloqueando su síntesis (figura 23-1).

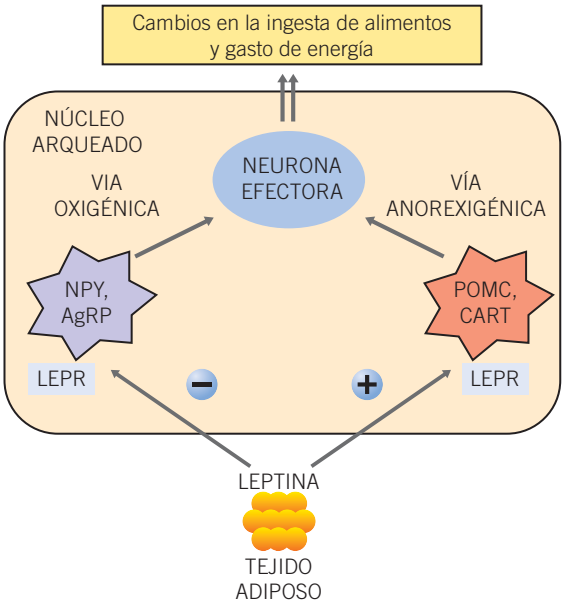


Figura 23-1. Regulación central del hambre y la saciedad. La liberación de leptina del tejido adiposo es dependiente de la adiposidad. La leptina se une al receptor de leptina (LEPR), el cual se encuentra en la superficie de las células secretoras de propiomelanocortina (POMC) y tránscrito regulador de anfetamina y cocaína (CART); a su vez se comunica con una neurona efectora, disminuyendo la ingesta de alimentos. Se muestra también cómo la leptina inhibe al neuropéptido Y (NPY) y a la proteína relacionada a Agouti, las cuales al comunicarse con una neurona efectora aumentan la ingesta de alimento.

POMC es una proteína de 285 aminoácidos sintetizada en el núcleo arqueado y el tracto solitario. Esta proteína puede sufrir una escisión proteolítica que resulta en la síntesis de ocho péptidos diferentes, como las tres isoformas de la hormona estimulante de melanocitos alfa, beta y gamma. CART es una proteína que promueve el balance negativo de energía, suprime la ingesta alimentaria y ejerce sus efectos mediante la unión a MC3R y MC4R, los cuales se expresan principalmente en cerebro. POMC y CART se comunican con una neurona efectora o de segundo orden, e inhiben la ingesta de alimentos. A esta serie de señales se le ha denominado *vía anorexigénica*. Por otro lado, NPY y AgRP son estimuladores de la ingesta de alimento y conforman la *vía orexigénica*. El NPY es un péptido de señalización anabólica que estimula el centro del hambre o del apetito, que se sintetiza en el cuerpo celular de las neuronas del núcleo arqueado en el hipotálamo y se transporta axonalmente al núcleo paraventricular, donde se encuentra a altas concentraciones. Por otro lado, AgRP es un antagonista de los MC3R, por lo que también estimula el hambre.

Regulación periférica

Péptidos y hormonas del tracto gastrointestinal

La regulación de la ingesta a corto plazo involucra señalización nerviosa y endocrina. En el tracto gastrointestinal se encuentran los mecanorreceptores y quimiorreceptores que llevan el estímulo del nervio vago hasta el bulbo raquídeo y generan señales de saciedad. Por otro lado, las hormonas gastrointestinales estimulan vías ascendentes vagales que van del tracto gastrointestinal hacia el bulbo raquídeo o directamente hacia neuronas en el hipotálamo. Se reconoce la existencia de péptidos y hormonas que actúan como señales orexigénicas, o de apetito, y anorexigénicas, o de saciedad, provenientes del tracto gastrointestinal. Las señales de saciedad causan sensación de plenitud y reducen la cantidad de alimentos que se consumen en un tiempo determinado (figura 23-2).

Preproglucagón y sus péptidos derivados

El gen de preproglucagón, o *GCG*, está localizado en el cromosoma 2q36-37 y su producto es una preproproteína modificada para dar lugar a cuatro péptidos maduros: péptido YY (PYY), péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), oxintomodulina y péptido similar al glucagón-2.

Péptido YY

Es un péptido de 36 aminoácidos, cuya principal isoforma está truncada y es conocido como PYY_{3-36}. Éste es sintetizado en las células L del intestino delgado y se encuentra en mayor concentración en el colon y el recto. PYY_{3-36} es liberado a la circulación después de ingerir alimentos y su nivel se reduce por ayuno y su administración ocasiona la reducción de la ingesta de alimentos. Este efecto puede ser el resultado de la activación de los circuitos para reducir la ingesta de alimentos o porque desencadena un efecto de rechazo a los alimentos representado como náuseas. Sin embargo, en algunos reportes se han observado niveles

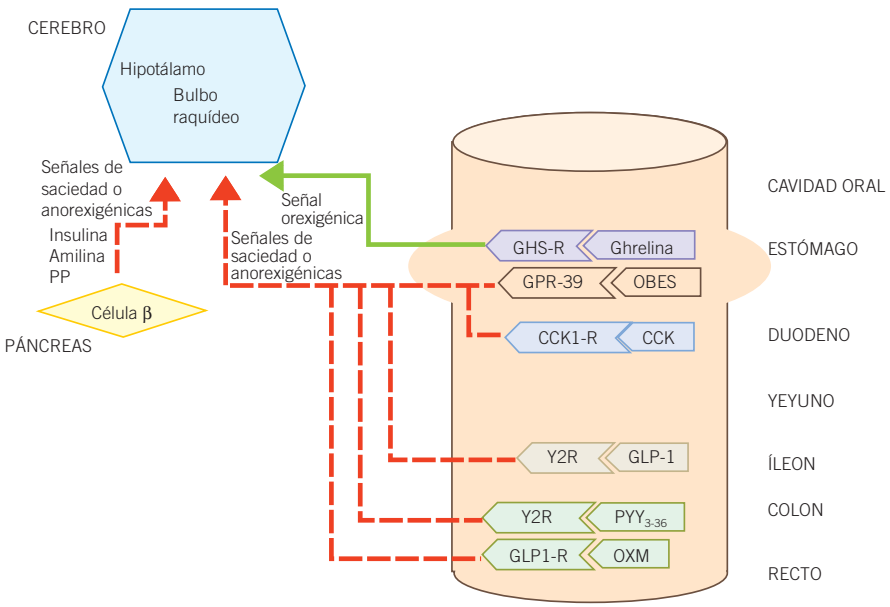


Figura 23-2. Regulación periférica. Las señales periféricas de saciedad o anorexigénicas y de apetito u orexigénicas provenientes del tracto gastrointestinal y del páncreas son integradas en el cerebro. PP, polipéptido pancreático; GHS-R, receptor de secretagogos de hormona de crecimiento; OBES, obestatina; GPR-39, receptor huérfano acoplado a proteínas G; CCK, colecistocinina; CCK1-R, receptor de la colecistocinina-1; GLP-1, péptido similar al glucagón-1; Y2R, receptor Y2 de neuropéptido Y; PYY_{3-36}, péptido YY aminoterminal truncado $_{3-36}$; GLP1-R, receptor del péptido similar a glucagón-1; OXM, oxintomodulina.

circulantes muy bajos de PYY en sujetos obesos tanto en ayuno como después de comer.

Péptido similar al glucagón-1

GLP-1 es una hormona neuropeptídica sintetizada por procesamiento postraduccional del preproglucagón en el SNC y en el intestino. Esta hormona activa neuronas en el núcleo arqueado, el núcleo hipotalámico paraventricular, el núcleo del tracto solitario y el área postrema. Se encuentra en mayor cantidad en el bulbo raquídeo donde contribuye en la homeostasis energética. GLP-1 es liberado hacia la circulación después de la ingesta de alimentos y se dispone de evidencias de que induce saciedad e incrementa el gasto energético mediante el aumento de la temperatura corporal. Además, funciona como supresor de la secreción de ácidos estomacales.

Oxintomodulina

Es un producto del gen del preproglucagón y se libera a la circulación después la ingesta de alimentos. Al parecer, la oxintomodulina se une al receptor de GLP-1 (GLP1-R). Estos receptores se encuentran tanto en el bulbo raquídeo como en el núcleo arqueado. La oxintomodulina reduce la ingesta de alimentos cuando se administra en humanos por vía periférica y, además, promueve el gasto energético.

Colecistocinina

El gen de la colecistocinina (CKK), llamado *CCK*, se localiza en el cromosoma 3p22-21.3, y se expresa ampliamente en el tracto gastrointestinal, particularmente en el duodeno y yeyuno. Es una proteína que consta de 115 aminoácidos y se libera cuando los lípidos entran en contacto en el estómago. Parte de la CCK actúa de manera local o parácrina estimulando los receptores CCK_1 en las fibras sensitivas del nervio vago, y otra parte de la CCK secretada entra a la circulación sanguínea y estimula la función del páncreas y de la vesícula biliar. Además, retarda el vaciamiento gástrico e incrementa la motilidad intestinal. También se expresa en el SNC y actúa como un neurotransmisor que regula el comportamiento de recompensa, saciedad, memoria y ansiedad. La CCK actúa rápidamente en la reducción de la cantidad de alimentos ingeridos y en la duración de un tiempo de comida, efectos potenciados por la distensión gástrica.

El efecto de la CCK a largo plazo en el peso corporal puede ser resultado parcial de la interacción con moléculas como la leptina, que potencian el efecto de saciedad de la CCK.

Bombesina

La bombesina es un tetradecapéptido, cuya estructura es similar a la del péptido liberador de gastrina (GRP) y a la de la neuromedina B. La bombesina se sintetiza ampliamente en el intestino y sus niveles plasmáticos se incrementan después de comer. Además, reduce la ingesta de alimentos con independencia de la CCK.

Polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa

El polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP) es un péptido residual de 42 aminoácidos liberado por las células K del duodeno después de la ingesta de alimentos. Aún no se ha reportado que ejerza una influencia aguda sobre la ingesta de alimentos, pero en ratones *knockout* del receptor de GIP, alimentados con dieta alta en grasa, se ha observado resistencia a la obesidad. Por ello, se sugiere que afecta directamente a los adipocitos en lugar de ejercer un efecto sobre la regulación central del hambre y la saciedad.

Ghrelina (hormona orexigénica)

El gen de la ghrelina, o prepropéptido de obestatina (*GHRL*), se localiza en el cromosoma 3p26-p25. El producto de este gen se procesa de forma postraduccional y origina la ghrelina y la obestatina. La ghrelina es una hormona peptídica de 28 aminoácidos, sintetizada principalmente por las células oxínticas del estómago, pero también en el duodeno, el íleon, el ciego y el colon. Se considera que es la única hormona orexigénica activa periféricamente, y su participación en la estimulación del hambre parece ser mediada por el hipotálamo.

A largo plazo, los niveles de ghrelina son regulados por la homeostasis energética. Cuando la ingesta energética está equilibrada con el gasto energético, se restringe la secreción de ghrelina, pero si las reservas energéticas disminuyen rápidamente hasta cierto límite, este cambio ocasiona un incremento de su liberación. A corto plazo, la concentración de ghrelina circulante se eleva con el ayuno y se reduce después de ingerir alimentos, por lo que se considera que la ghrelina está involucrada en la obesidad. La administración de ghrelina en humanos incrementa la sensación de hambre y la ingesta de alimentos; además, promueve el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo.

El otro producto del gen *GHRL* es el péptido llamado *obestatina*, que se une al receptor huérfano 39 acoplado a proteínas G (GPR-39) en el estómago, el yeyuno y el íleon. La administración de obestatina por vía periférica o intraventricular en modelos murinos reduce la ingesta y, además, por vía periférica, también disminuye la ganancia de peso.

Hormonas pancreáticas

Polipéptido pancreático

El polipéptido pancreático (PP) consta de 36 aminoácidos y es liberado por el páncreas después de la ingesta de alimentos. Se deriva de un precursor llamado *polipéptido prepropancreático*, cuyo gen se localiza en el cromosoma 17q21. La cantidad liberada de PP es proporcional al contenido

energético de los alimentos consumidos. Además, para que PP se libere y posteriormente se transporte a la circulación, se requiere de la digestión de lípidos. La infusión intravenosa de PP reduce la ingesta de alimentos no sólo a corto plazo (2 horas), sino también en las siguientes 24 horas. Este efecto puede deberse al retraso del vaciamiento gástrico.

Amilina

La amilina, también conocida como polipéptido amiloide de los islotes, es un péptido residual de 37 aminoácidos que pertenece a la familia de los péptidos de calcitonina, codificada por el gen del polipéptido amiloide de los islotes (*IAPP*), que se localiza en el cromosoma 12p12.1. La amilina se libera junto con la insulina por las células β-pancreáticas en respuesta a la ingesta de alimentos. Aunque se cree que su función principal es participar en la homeostasis de la glucosa, cuando se administra periféricamente ocasiona reducción de peso, y si se administra a dosis suprafisiológicas, puede reducir la ingesta de alimentos.

Insulina

La insulina se considera como un regulador clave periférico de la ingesta de alimentos. El gen de la insulina (*INS*) en humanos se localiza en 11p15.1 y codifica para la preproinsulina que da origen a la insulina. Los niveles plasmáticos de insulina se correlacionan directamente con el peso corporal y con la adiposidad. La insulina plasmática se incrementa con la ingesta de alimentos y en cualquier otra condición de balance energético positivo, y disminuye durante el ayuno, así como en periodos de balance energético negativo. La insulina se correlaciona con el balance energético a largo plazo. Por otro lado, el receptor de insulina se expresa a nivel central en los núcleos arqueado, dorsomedial y paraventricular, por lo que los niveles plasmáticos de insulina participan en la homeostasis energética. Se dispone de evidencias de que la insulina actúa como una señal anorexigénica en el sistema nervioso central. La administración central de insulina o de un mimético de insulina disminuye la ingesta y el peso corporal, pero también altera la expresión de genes hipotalámicos que se sabe que regulan la ingesta de alimentos. La administración de insulina en el tercer ventrículo (i3vt) disminuye la expresión de NPY en el núcleo arqueado. Recientemente, se ha descubierto que el sistema de la melanocortina es un mediador de las acciones centrales de la insulina.

Factores asociados a la obesidad

El medio ambiente moderno, consecuencia del desarrollo científico-tecnológico, económico y social, entre otros, ha propiciado mala alimentación y falta de actividad física. En la actualidad, las razones para ingerir alimentos no se basan solamente en señales fisiológicas o neuroendocrinas, sino que responden a la exposición a señales de comida, a la disponibilidad de alimentos densamente energéticos, a la palatabilidad y a la gran diversidad en sabores y olores. Estos factores afectan las áreas corticolímbicas del cerebro, relacionadas con el aprendizaje, la memoria, la recompensa, el humor y las emociones. Como consecuencia, se crean asociaciones positivas entre los alimentos y factores psicológicos que contribuyen a la anulación de las señales orgánicas, tanto de hambre como de saciedad. Incluso otros factores, como las costumbres, los hábitos, el apego a horarios y el estrés, generan cambios en la alimentación. Los factores mencionados ocasionan el consumo excesivo de nutrimentos cuando en realidad no se necesitan. Por otro lado, la inactividad física es consecuencia del cambio en las jornadas de trabajo, la falta de espacios propicios para el ejercicio, la disminución de la necesidad de desplazamiento para satisfacer necesidades básicas, etc. La inactividad física, o sedentarismo, conduce a la disminución del gasto energético y a que no se utilicen las reservas energéticas. Así, los factores ambientales (figura 23-3) contribuyen al desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético, lo que propicia el desarrollo de obesidad.

Genética de la obesidad

Obesidad monogénica

La obesidad monogénica se debe a la mutación de un solo gen que participa en la regulación central del hambre y la saciedad. Cabe destacar que este tipo de mutaciones son poco frecuentes y ocasionan obesidad severa. La mutación homocigota del gen *LEP* (ΔG133) ocasiona la deficiencia congénita de leptina, que causa hiperfagia y conduce al desarrollo de obesidad de inicio temprano y obesidad severa en la edad adulta. Los individuos heterocigotos para dicha mutación presentan niveles de leptina circulantes menores y una mayor prevalencia de obesidad. Por otro lado, las mutaciones homocigotas del gen del receptor de la leptina, que generan un receptor truncado antes del dominio transmembranal, ocasionan un fenotipo similar al de la deficiencia de leptina congénita. Las mutaciones homocigotas de *POMC*, que ocasionan la pérdida total de la función, o heterocigotas conducen a hiperfagia y obesidad de inicio temprano. También se han encontrado mutaciones heterocigotas sin sentido (Arg 236Gly) en *POMC*, asociadas con susceptibilidad a la obesidad, e incluso se han observado en varios niños con obesidad de inicio temprano.

Otro de los genes con mutaciones heterocigotas descritas es el de la prohormona convertasa 1 (*PGC-1*), encargada de modificaciones postraducciones de proteínas, por ejemplo de POMC. Una de las principales causas monogénicas de obesidad es la deficiencia de *MC4R*, cuyas mutaciones heterocigotas se han reportado en varios grupos étnicos.

Obesidad sindrómica

Al menos 20 síndromes son causados por defectos genéticos o anomalías cromosómicas, tanto autosómicas como

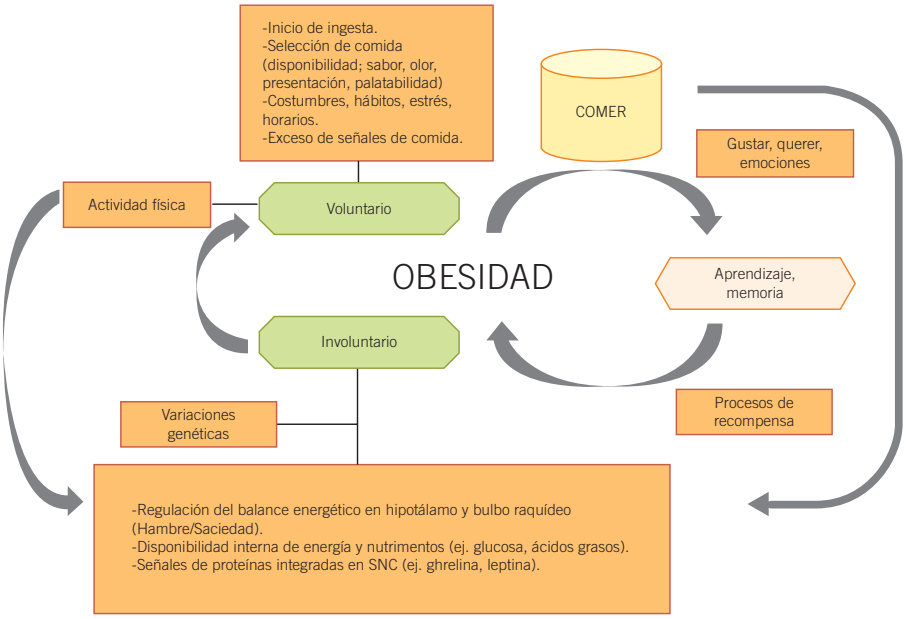


Figura 23-3. Factores involucrados en la obesidad. En el desarrollo de obesidad el consumo de alimentos y la actividad física juegan un papel muy importante. El desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético propicia el desarrollo de obesidad. La ingesta de alimento está regulada por señales fisiológicas y neurológicas, así como por la disponibilidad de alimento. Estos factores afectan áreas corticolímbicas del cerebro creando asociaciones positivas entre los alimentos y factores psicológicos que estimulan a las personas a comer aun sin sentir hambre.

ligadas al cromosoma X. Estos síndromes se caracterizan por presentar obesidad y, en la mayoría, también existe retraso mental.

El síndrome de Prader-Willi (PWS) es uno de los más frecuentes. Este síndrome es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por obesidad, hiperfagia, hipotonía muscular, retraso mental, estatura baja e hipogonadismo hipogonadotrófico. Recientemente, se sugirió que la síntesis elevada de ghrelina en personas con PWS podría aumentar el apetito por la interacción con POMC/CART y NPY. En seres humanos, la deleción o disrupción del SIM1 (*single minded homologue 1*) resulta en un fenotipo similar al del PWS o en obesidad de desarrollo temprano asociada a hiperfagia.

El síndrome de Bardet-Biedl (BBS) se caracteriza por distrofia de conos y bastones en el ojo, polidactilia, dificultades en el aprendizaje, hipogonadismo en hombres, malformaciones renales y obesidad que se desarrolla en los primeros cinco años de vida.

Obesidad poligénica

Cada día existen más evidencias de que las variaciones genéticas, como los SNP, desempeñan un papel importante en la epidemia de obesidad. Estos SNP tienen efectos modestos en la susceptibilidad individual de formas comunes de obesidad, pero debido a su alta frecuencia pueden contribuir más a la obesidad a escala poblacional. Para el estudio de las variaciones genéticas se han desarrollado estrategias que permiten identificar los genes involucrados en la obesidad poligénica, como el estudio de genes candidato o el escrutinio completo del genoma para detectar regiones cromosómicas ligadas a rasgos cuantitativos (*quantitative traits loci*, QTL) asociados a la obesidad. La mayoría de los genes localizados están involucrados en la regulación del metabolismo energético, el control del apetito o la señalización autocrina y paracrina del adipocito.

La obesidad asociada a diversos SNP es la forma más frecuente de la enfermedad. Se han detectado SNP en genes involucrados en el metabolismo de lípidos y glucosa, así como en genes que participan en la regulación del hambre, la saciedad y el gasto energético.

Genes asociados a la obesidad

Las variaciones en los alelos asociados a la obesidad pueden explicar sólo una pequeña proporción de las variaciones del IMC. El rango calculado entre estas variaciones va de 0.05 a 0.24 de IMC para cada alelo. De esta forma, en los individuos portadores de un gran número de alelos que impliquen riesgo se espera que tengan un IMC mayor.

En el cuadro 23-2 se muestran los genes asociados a obesidad, a variaciones del IMC y a fenotipos relacionados con obesidad. También se indica en qué tejido se expresan principalmente dichos genes.

Cuadro 23-2. Genes asociados a obesidad y a variación en el IMC.

Gen	Función o actividad	Fenotipo relacionado	Tejidos donde se expresa
Adiponectina (*ADIPOQ*)	Flujo de oxidación de ácidos grasos, mejora la sensibilidad a la insulina, inhibe la fagocitosis, evita la formación de células espumosas, inhibe la producción de IL-6 y TNF-α, inhibe la fagocitosis.	Glucemia, DM2, dislipidemia, RI, enfermedades coronarias.	A (blanco y pardo)
Receptor beta adrenérgico 2 (*ADRB2*)	Estimula la lipólisis en los adipocitos.	Obesidad (ciertos grupos étnicos).	A, C
Receptor beta adrenérgico 3 (*ADRB3*)	Termogénesis, lipólisis.	Obesidad, hiperinsulinemia, hipertensión.	C
Receptor de melanocortina (*MC4R*)	Regulación del apetito a nivel hipotalámico.	La haploinsuficiencia está asociada a obesidad mórbida. Hiperfagia. Hiperinsulinemia.	H, núcleo arqueado del hipotálamo
Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*PPARG*)	Controla la diferenciación de adipocitos. Oxidación de ácidos grasos. Acción sobre el metabolismo de lipoproteinas. Inhibidor benéfico de los procesos inflamatorios de la pared vascular.	Enfermedades cardiovasculares, DM2 y obesidad.	M,L,A, macrófagos, intestino delgado, células endoteliales vasculares.
Proteína desacopladora 1 (*UCP1*)	Termogénesis, regular la eficiencia de la oxidación fosforilativa, permite el paso de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz provocando la disipación del gradiente de potencial electroquímico de protones en forma de calor sin irritación adaptativa.	Asociado a obesidad en el adulto.	A (pardo)
Proteína desacopladora 2 (*UCP2*)	Termogénesis, vinculado al control de ROS.	Obesidad	A, L, C, bazo, pulmón, intestino, testículo, cerebro, útero, células beta pancreáticas.
Proteína desacopladora 3 (*UCP3*)	Termogénesis, vinculado en el metabolismo de los lípidos y al control de las ROS.	Obesidad	M, A (pardo), C
Asociado a masa grasa y obesidad (*FTO*)	Control de energía.	Asociado a DM2, tejido adiposo y obesidad, conductas alimentarias (4).	H (núcleo arqueado), A
Factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*)	Su expresión está regulada por el estado nutricional y la señalización de MC4R.	Asociado a DM2. Individuos con la deleción de BDNF tienen un IMC > percentil 95.	H
Relacionado a fosfodiesterasa (*PTER*)	Rompe nucleótidos cíclicos que son importantes para la transmisión de señales dentro de la célula.	Obesidad	L, H
SH2B Proteína adaptadora 1 (*SH2B1*)	A nivel neuronal participa en la homeostasis energética. Metabolismo de glucosa.	Los ratones sin Sh2b1 son obesos y diabéticos. Obesidad mórbida, DM2.	A, L, M SNC, cerebro
Oncogén homólogo del fibrosarcoma músculo aponeurótico v-maf (*MAF*)	Involucrado en la síntesis del factor de crecimiento endotelial y la progresión del ciclo celular.	Participa en la adipogénesis y en la regulación insulina-glucagón.	Linfocitos T, Células Natural Killer.
Niemann-Pick tipo C-1a (*NPC1*)	Transporte de lípidos intracelular.	Los ratones sin Npc-1 muestran inicio tardío de pérdida de peso y baja ingesta alimenticia.	H, A
Regulador de crecimiento neuronal tipo 1 (*NEGR1*)	Crecimiento neuronal.	Obesidad	Neuronas sensitivas y simpáticas.
Proteína transmembranal 18 (*TMEM18*)	Desarrollo neural y migración neuronal.	Asociado a DM2, asociado al IMC en niños y adolescentes.	Neuronas del hipotálamo y tronco cerebral.

RI, resistencia a la insulina; DM2, diabetes mellitus tipo 2; ROS, especies reactivas de oxígeno; IL6, interleucina 6; TNFα, factor de necrosis tumoral alfa; IMC, índice de masa corporal; H, hipotálamo; L, hígado; A, adipocito; M, músculo estriado; C, corazón; SNC, sistema nervioso central.

Ejercicios de integración

1. ¿Qué es la obesidad?
2. ¿Cuáles son las proteínas expresadas por el tejido adiposo?
3. ¿Qué factor determina la modificación de los niveles de leptina?
4. Mencione los efectos de la leptina a nivel central, sobre la vía orexigénica y la vía anorexigénica.
5. ¿A qué se refieren los términos *bloque leptinérgico* o *resistencia a la leptina?*
6. Enliste los péptidos o proteínas sintetizados en el tracto gastrointestinal y en el páncreas que participan en la saciedad.
7. Indique qué genes son los causantes de obesidad monogénica.
8. Escriba 10 genes asociados a obesidad.
9. Señale tres factores relacionados con la alimentación que contribuyen al desarrollo de obesidad.
10. Comente dos hechos que intensifican el sedentarismo y, por tanto, el desarrollo de obesidad.

Bibliografía

Aguilar C., García E., Robles L., Riaño D., Ruiz D., García A., *et al.* High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. *J Clin Endocrinol Metab,* 2008;93(10):4075-4079.

Bell C., Walley A., Froguel P. The genetics of human obesity. *J Nature Rev,* 2005;6:221-234.

Benoit S., Clegg D., Seeley R., Woods S. Insulin and leptin as an adiposity signals. *Endoc Soc,* 2004;267-376.

Canizales S. Aspectos genéticos de la obesidad. *Rev Endocrinol Nutr,* 2008;16(1):9-15.

Cees de Graaf, Blom W., Smeets P., Stafleu A., Hendriks H. Biomarkers of satiation and satiety. *Am J Clin Nutr,* 2004;79:946-961.

Den M., Ekelund U., Brage S., Grontved A., Hua J., Sharp S, *et al.* Genetic susceptibility to obesity and related traits in childhood and adolescence. *Diabetes,* 2010;59(11):2980-2988.

Farooqi I., O'Rahilly S. Monogenic human obesity syndrome. *Rec Prog Horm Res,* 2004;59(1):409-424.

Ferranti S., Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem,* 2008;54(6):945-955.

Formiguera X. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best PracRes Clin Gastroenterol,* 2004;18(6):1125-1146.

Gómez R., Conde J., Gómez J., Lago F., Gualillo O. Las adipocinas; mediadores emergentes de la respuesta inmune y de la inflamación. *Reumatol Clin,* 2009;5(Suppl 1):6-12.

Hofker M., Wijmenga C. A supersized list of obesity genes. *Nat Genet,* 2009;41(2):139-140.

Kadowaki T., Yamauchi T., Kubota N., Hara K., Ueki K., Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Inv,* 2006:116(7):1784-1792.

Kalra S., Ueno N., Kalra P. Stimulation of appetite by ghrelin is regulated by leptin restraint: peripheral and central sites of action. *J Nutr,* 2005;1331-1335.

Miranda L., Reza A. Inflamación, obesidad y diabetes. *Gac Méd Méx,* 2008;144(1):39-46.

Murphy K., Bloom S. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature,* 2006;444(14):854-859.

Murphy K., Dhillo W., Bloom S. Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Endocrine Rev,* 2006;27(7):719-727.

Nguyen D., Hashem B. El-Serag. The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterol Clin North Am,* 2010;39(1):1-7.

Pérez M. El adipocito como órgano endocrino. Implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Rev Med,* 2007;15(2):225-242.

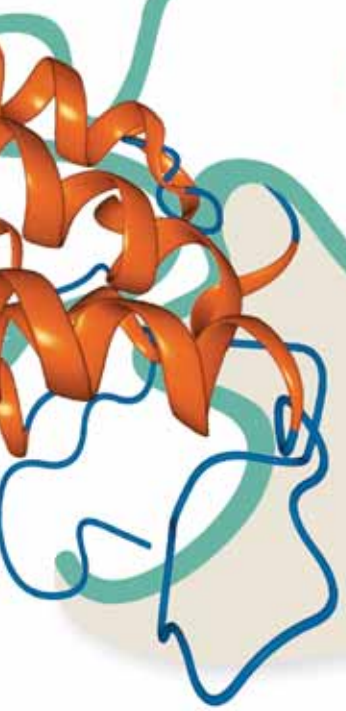
Stanley S., Wynne K., McGowan B., Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev,* 2005;85:1131-1158.

Walley A., Asher J., Froguel P. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat Rev Genet,* 2009; Epub Jun 9, 2009:1-12.

Walley A., Blakemore A., Froguel P. Genetics of obesity and the prediction of risk for health. *Human Mol Gen,* 2006;15(2):R124-R130.

Wynne K., Stanley S., McGowan B., Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol,* 2005;184:291-318.

Zheng H., Berthoud H. Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism. *Physiology,* 2008;23:75-83.



Capítulo 24

Bases moleculares de la hepatitis B

Laura Verónica Sánchez Orozco / Miriam Bueno Topete
Juan Armendáriz Borunda

Introducción

El término *hepatitis* significa "inflamación del hígado", y las causas más comunes de esta inflamación son las infecciones por uno o más de los virus conocidos como virus de la hepatitis A, B, C, D y E (VHA, VHB, VHC, VHD, VHE, respectivamente). Todos estos virus pueden causar una enfermedad aguda con síntomas que duran varias semanas, como ictericia (color amarillo en la piel y los ojos), orina oscura, fatiga extrema, náuseas, vómitos y dolor abdominal. De los virus mencionados anteriormente, el VHB y el VHC pueden ser asintomáticos, sin daño hepático aparente, en personas portadoras, o bien causar manifestaciones clínicas como la aparición de una hepatitis crónica con evolución a cirrosis hepática, que puede culminar con un carcinoma hepatocelular.

En relación con el VHB, los avances de la biología molecular han contribuido de forma considerable a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la hepatitis B. En la actualidad, se conoce con precisión la organización genómica y los mecanismos de transcripción y replicación del virus. Para ello, se cuenta con métodos diagnósticos que permiten identificar de forma directa la presencia del genoma de este virus en muestras biológicas. Además, se dispone de una vacuna recombinante muy efectiva (ofrece 90% de protección) y con efectos colaterales mínimos. La producción de antígenos recombinantes también ha permitido mejorar el diagnóstico serológico para la detección de los antígenos virales y/o de los anticuerpos que se forman en respuesta a la infección. A pesar de los esfuerzos realizados por los diferentes grupos de investigación, aún no se cuenta con un tratamiento ideal. Los medicamentos aprobados para tratar la hepatitis B son el interferón, la lamivudina, el adefovir dipivoxil, el entecavir y el tenofovir. El tratamiento con antivirales ha mostrado una mejoría clínica en algunos pacientes y se ha visto una disminución en la aparición del carcinoma hepatocelular en países con alta endemia de esta afección. Sin embargo, comúnmente se presentan variantes del virus resistentes a los fármacos, lo que pone de manifiesto la necesidad de extender las medidas de prevención y diagnóstico a escala mundial y continuar la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento más efectivas, con el objeto de lograr erradicar la hepatitis B.

Epidemiología mundial

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 2 000 millones de personas están infectadas por el VHB, de las cuales 350 millones presentan una infección crónica. Es la décima causa de muerte a escala mundial y al año mueren alrededor de 500 000 a 1.2 millones de personas por complicaciones de infección por el VHB. La distribución de esta infección en el mundo es heterogénea, por lo que se divide en tres categorías geográficas, basadas en la prevalencia de portadores crónicos al HBsAg: a) áreas con una prevalencia elevada (> 8%); b) áreas con prevalencia intermedia (2 a 8%), y c) áreas con prevalencia baja (< 2%). Dentro de las regiones con una prevalencia elevada se encuentran algunos países de África, el sureste de Asia y China. Las zonas de prevalencia intermedia incluyen el este y el sureste de Europa, África del norte, Oriente Medio, Japón, India y algunas partes de Sudamérica. Estados Unidos y Europa occidental son zonas de baja endemia. En México, los estudios, aunque no representan a la población en general, sugieren que es un país con baja endemia, con algunas zonas de prevalencia intermedia.

Vías de transmisión

- Perinatal (madre a hijo).
- Inyecciones y transfusiones de productos sanguíneos no seguras.

- Contacto sexual.
- Uso de jeringas y agujas no estériles.

En los países con prevalencia elevada, la mayoría de las infecciones se adquieren por vía perinatal y durante la etapa temprana de la infancia, cuando el sistema inmune es inmaduro. En esas regiones, el cáncer hepatocelular se encuentra dentro de las tres primeras causas de muerte. En los países con endemias moderada y baja, la hepatitis B se adquiere en el adulto joven por actividad sexual y el consumo de drogas por vía intravenosa. Además, la hepatitis B es la principal infección viral que se presenta en los trabajadores de la salud por punción accidental o por trabajar sin las medidas de prevención suficientes, sobre todo en los países donde el uso de la vacuna no está generalizado.

Virus de la hepatitis B

Para entender los conceptos de la historia natural de la hepatitis B, su prevención, diagnóstico y tratamiento, en primer lugar es importante conocer los aspectos fundamentales del VHB, la organización de su genoma y las características más importantes de sus proteínas.

El VHB se clasifica dentro de la familia ***Hepadnaviridae***, del género *Orthohepadnavirus*, presenta tropismo por el hígado y se caracteriza por ser un virus de **ADN** circular de doble cadena, el cual se replica a través de un **ARN intermediario** mediante **transcripción inversa**. El genoma del VHB puede integrarse en los cromosomas del hospedero. En vivo, el hígado es el principal órgano de replicación del virus; sin embargo, se han encontrado genomas virales intermediarios de la replicación fuera del hígado, como en el epitelio del ducto biliar, el páncreas, las células renales, los linfocitos y los monocitos. La partícula viral madura está compuesta de una nucleocápside rodeada por una bicapa de lípidos en la cual se incorporan las proteínas de la envoltura. Dentro de la nucleocápside se encuentra el genoma viral que contiene toda la información genética organizada.

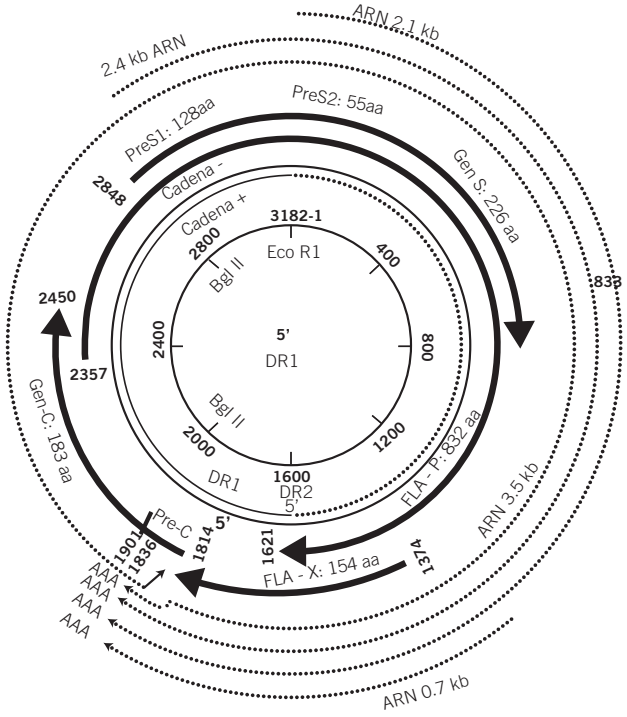


Figura 24-1. Genoma del virus de la hepatitis B y sus tránscritos. En el círculo del centro del genoma, se especifica el número del nucleótido. Como referencia, se considera la primera base dentro del sitio de restricción de EcoR1; le sigue el doble círculo con una línea continua y una discontinua, este doble círculo representa el ADN del VHB (una de sus hebras no está completa, la parte que carece de nucleótidos está representada por la línea discontinua). Posteriormente, las flechas con línea continua representan las regiones o fragmentos de lectura abierta (FLA) y genes del virus; se especifica su nombre y el número de aminoácidos que se sintetizan durante su traducción. Las flechas con línea discontinua representan los ARN que se transcriben del genoma viral que participan en la replicación del virus (ARN 3.5 kb) y/o en la traducción de sus proteínas.

Genómica y proteómica

El **genoma del VHB** está constituido por ADN de 3 200 pb, aunque su tamaño varía un poco según el genotipo. Si a esta característica tan peculiar de tener un genoma pequeño se le agrega que durante la replicación utiliza un ARN intermediario (con una transcriptasa inversa que no corrige errores), puede concluirse, entonces, que se trata de un virus con una **tasa de mutación intermedia** (entre un virus de ADN y uno de ARN). Una característica más del ADN del VHB es que una de sus cadenas es más pequeña que la otra. Se divide en **cuatro** regiones principales que son **fragmentos de lectura abierta (FLA)**: **S, C, P** y **X** (figura 24-1). Estos FLA contienen los genes que codifican para las proteínas de la envoltura viral, las proteínas de la cápside, el antígeno e (HBeAg), la polimerasa y la proteína X, y dado que estos genes se sobreponen, la mayoría de las bases del ADN del genoma del VHB participan en la codificación de dos proteínas virales. En la figura 24-1 y en el cuadro 24-1 se muestra la organización del genoma del VHB, sus tránscritos, las proteínas y las características principales de estas moléculas.

Replicación

Una vez que el virus penetra en el hepatocito, libera la nucleocápside en el citoplasma (figura 24-2). A continuación, el genoma viral se transporta al núcleo mediante mecanismos aún no bien definidos. Después, la cadena positiva del ADN viral no completa se termina de sintetizar por medio de la polimerasa viral, donde forma un **ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc)**. La ARN

Cuadro 24-1. Genoma, y proteoma del VHB y características principales de sus moléculas.

FLA	Gen/ región	Proteína codificada	Función y características
P	P	Polimerasa	Replicación del genoma viral. Contiene 4 dominios: 1) N terminal que participa en la encapsulación y en el inicio de la síntesis de la cadena negativa; 2) RT, región catalítica que sintetiza el genoma viral, 3) ARNAsa H, su función es degradar el ARNpg, y 4) un espaciador de función desconocida.
S	Pre-S1 Pre-S2 Gen S	Tres proteínas de la envoltura viral: Pre-S1 + Pre-S2 + Gen S = "Proteína grande" Pre-S2 + Gen S = "Proteína mediana" Gen S = "Proteína pequeña"	Forman parte estructural de la envoltura del virus. Las tres proteínas tienen en común la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal (lo correspondiente a la proteína pequeña es lo que se conoce como el HBsAg). En la proteína grande se encuentra un sitio de reconocimiento al hepatocito, por lo que se considera que sirve de entrada del VHB a la célula del huésped. En el HBsAg se encuentran los principales determinantes antigénicos que son reconocidos por los anticuerpos que se producen en respuesta a la infección o a la vacuna que inhiben la entrada del virus al hepatocito. La vacuna contra este virus es la primera vacuna recombinante que se produjo, a la fecha se continúa utilizando el HBsAg como inmunógeno.
C	Pre-C Gen C	Dos proteínas: Región Pre-C + Gen C = HBeAg Gen C = La proteína central (HBcAg)	HBeAg. Es la forma soluble del HBcAg. Necesario para una infección persistente. Cruza barrera placentaria. Proteína central. Forma parte estructural de la nucleocápside del virus. Se ensamblan aproximadamente 180 subunidades de esta proteína para formar esta estructura viral. Favorece el reconocimiento de la polimerasa y el ARN intermediario viral, los cuales son encapsulados y ahí se realiza la síntesis del ADN viral a partir del ARN intermediario.
X	Gen X	Proteína X	Regulador transcripcional, favorece la transcripción de su propio gen y de genes del hospedero, entre ellos, *c-myc, c-fos.*

FLA, fragmento de lectura abierta; RT, transcriptasa inversa; HBsAg, antígeno de superficie del VHB; HBeAg, antígeno e del VHB.

polimerasa II del huésped transcribe la cadena negativa del ADN viral en un ARN pregenómico (ARNpg) de 3.5 kb y tres ARN mensajeros (ARNm) que sirven para la traducción de las proteínas virales.

El ARNpg sale del núcleo y, en el citoplasma, tiene dos funciones: por un lado, sirve como mensajero para la síntesis de la polimerasa y de la proteína central, y por otro, es un intermediario en el proceso de la replicación. Si el ADN viral continúa el tiempo suficiente en la célula, se convierte en bicatenario, y en este caso regresa al núcleo para otra ronda replicativa (figura 24-2). Sin embargo, cuando se forma un ADN de doble cadena parcial, la nucleocápside madura e interactúa con las proteínas de la envoltura en el retículo endoplásmico, para formar la partícula viral completa de 42 nm, que es secretada mediante exocitosis.

Historia natural de la hepatitis B

La probabilidad de desarrollar **infección aguda con la sintomatología característica** (ictericia, dolor abdominal, orina oscura, fiebre) y la eliminación posterior del VHB está

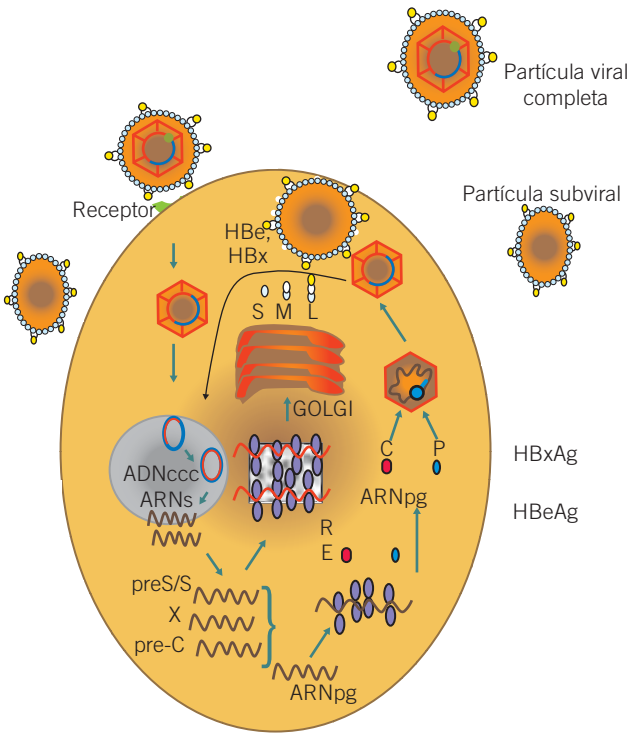


Figura 24-2. Ciclo de vida del VHB. El VHB entra a la célula por un receptor, libera la envoltura en el citoplasma; posteriormente, pierde la nucleocápside y entra al núcleo. La cadena no completa se termina de sintetizar formando el ADNccc. La ARN pol II del huésped sintetiza los ARN virales. En los ribosomas libres se sintetizan la polimerasa viral y proteínas cápside. Dentro de ésta se sintetiza el ADN a partir del ARNpg. En el retículo endoplásmico rugoso se sintetizan las proteínas que envuelven al genoma viral y, junto con lípidos del hospedero, envuelven a la cápside para liberar la partícula viral completa. Partículas subvirales, HBeAg y el HBxAg, son secretadas de la célula.

relacionada con la edad; en niños menores de cuatro años se presenta en sólo 10% de los casos, aproximadamente, mientras que en los adultos jóvenes, la proporción es mayor (aproximadamente, 90%). En cambio, la probabilidad de evolucionar a una **hepatitis crónica** por el VHB es elevada en los individuos infectados por vía perinatal (90%) o durante la infancia (20 a 30%), comparada con la que se adquiere cuando se infecta un adulto inmunocompetente (< 10%). Se han descrito tres fases de la hepatitis crónica según lo observado durante el seguimiento de los individuos infectados a edad temprana. Estas fases son: a) inmunotolerancia, con biopsia hepática normal o con cambios mínimos de inflamación sin fibrosis; b) fase inmunoactiva, que se subdivide en b1) HBeAg positivo y b2) HBeAg negativo, con inflamación hepática con o sin presencia de fibrosis determinada mediante biopsia hepática, y c) fase de hepatitis B inactiva, en la que la inflamación hepática con o sin fibrosis puede mejorar con el tiempo y, en algunas, ocasiones puede no detectarse el HBsAg. En el cuadro 24-2 se describen las principales características de estas fases.

La mayoría de los portadores del VHB experimentan la **seroconversión** del HBeAg; esto quiere decir que la proteína HBe del VHB no se detecta en sangre y aparecen los anticuerpos dirigidos contra esta proteína. Esta seroconversión generalmente se asocia a un buen pronóstico en la evolución de la hepatitis B.

El resultado a largo plazo de la hepatitis crónica B es heterogéneo. La incidencia anual de cirrosis clínicamente diagnosticada se estima de 2 a 3%, los factores de riesgo para desarrollar cirrosis incluyen edad avanzada, presencia de HBeAg y niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT). La incidencia anual de carcinoma hepatocelular (CHC) se estima que es menor a 1% en los pacientes sin cirrosis y de 2 a 3% en los pacientes con esta enfermedad. El CHC se presenta más en hombres comparado con mujeres 3:1 a 4:1, y otros factores de riesgo para el desarrollo de CHC incluyen presencia de cirrosis, edad avanzada, historia familiar de CHC y coinfección con hepatitis C.

La eliminación espontánea anual del HBsAg se presenta en 0.5 a 0.8% de los pacientes con hepatitis B crónica. Se considera que las personas que eliminan este antígeno están en la fase de **"recuperación"** de la hepatitis; sin embargo, se dispone de evidencias de que, aun cinco años después, en más de 20% puede detectarse el ADN-VHB en muestra sanguínea, y más aún, en los individuos que se considera que han eliminado el ADN-VHB, se sigue detectando el ADNccc del VHB en el hígado. Los pacientes que eliminaron el HBsAg sin desarrollar cirrosis también presentan riesgo de desarrollar CHC. Esto puede ocurrir porque el genoma del VHB permanece en muy bajas concentraciones en sangre e hígado y porque tiene la capacidad de integrarse en el genoma del hepatocito, lo que puede conducir a alteraciones celulares. Por ello, las personas que fueron HBsAg positivas y que se encuentran en fase de "recuperación" deben continuar realizándose evaluaciones clínicas de por vida para detectar un CHC.

Factores que influyen en la gravedad de la hepatitis B

Carga viral

Se dispone de evidencias que muestran que la incidencia de cirrosis se incrementa en los pacientes con una carga viral elevada.

Cuadro 24-2. Interpretación de las pruebas serológicas.

Fase de la enfermedad	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc	ADN-VHB Copias/ml	ALT	Historia
Hepatitis B aguda	+	–	+	–	IgM +	Positivo	Elevadas	Evidencia de exposición reciente.
Infección resuelta	–	+/–	–	+/–	+/–	ND	Normales	Exposición en el pasado.
Inmunizado	–	+	–	–	–	Negativo	Normales	Vacunación.
Fases de la hepatitis B crónica								
Inmunotolerante	+	–	+	–	+	$>10^7$	Normales	Edad joven (2ª o 3ª década), infectado en la infancia.
Inmunoactiva (HBeAg +)	+	–	+	–	+	$>10^5$	Elevadas	Infección distante.
Inmunoactiva (HBeAg –)	+	–	–	+	+	$>10^4$	Elevadas persistentemente o indeterminadas	Infección distante (más común en personas de mayor edad).
Portador inactivo HBsAg	+	–	–	+	+	ND-10^4	Normales	

HBsAg, antígeno de superficie del VHB; Anti-HBs, anticuerpos dirigidos contra el HBsAg; HBeAg, antígeno e del VHB; Anti-HBe, anticuerpos contra el HBeAg; Anti-HBc, anticuerpos contra el antígeno central del VHB; ALT, alanina aminotransferasa; ND, no detectable (los métodos más sensibles de detección del ADN-VHB no logran detectar menos de 60 copias/ml).

Genotipo del virus de la hepatitis B

A la fecha se han definido 10 genotipos que se designan con las letras del alfabeto, de la A a la J, y múltiples subtipos. La clasificación se basa en una diferencia de 8% en la secuencia de nucleótidos del genoma completo. Los distintos genotipos presentan una distribución geográfica diferente: el genotipo A predomina en el norte de Europa, América e India; los genotipos B y C, en Asia y el Pacífico; el genotipo D se detecta principalmente en el Mediterráneo, gran parte de Rusia e India; el genotipo E se localiza en África; el genotipo F, en América Central y del Sur, y el genotipo H es el que predomina en México. El genotipo G se ha identificado en Francia, Alemania, Estados Unidos y México. La determinación del genotipo se consideró útil para precisar el pronóstico de la respuesta al tratamiento. Estudios en que se comparan el genotipo A con el D y el B con el C muestran que los pacientes infectados con los genotipos A y B responden mejor a la terapia con interferón alfa. También existen estudios que sugieren que los pacientes infectados con el genotipo A eliminan con mayor facilidad el HBsAg sin necesidad de terapia. Así, en un paciente con genotipo A en quien se observa que los niveles del ADN viral están disminuyendo, se recomienda esperar para valorar si se produce la eliminación viral sin necesidad de tratamiento. En cambio, si el paciente no logra eliminar la infección viral por medio de su sistema inmune, se valorará si pueden recibir tratamiento, ya que de no ser así se le pronosticaría una enfermedad hepática grave.

La determinación del genotipo podría utilizarse en el futuro para identificar pacientes con alto riesgo de progresión de la enfermedad. Se dispone de estudios que indican que existe una correlación entre el genotipo y la gravedad de la enfermedad hepática. Las infecciones con el genotipo C, F1 y B2-5 se han asociado con un alto riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular; en cambio, las infecciones con los genotipos B1, B6 y A2 parecen estar asociadas con un riesgo menor de presentar complicaciones hepáticas. Sin embargo, es necesario incrementar el número de estudios, ya que esta comparación no se ha estudiado en la mayoría de los genotipos del VHB.

En México, en donde predomina el genotipo H, no se cuenta con estudios clínicos que permitan conocer si existe una asociación entre el genotipo del VHB y el nivel de gravedad de daño hepático, la respuesta al tratamiento y la vulnerabilidad del virus a desarrollar mutaciones de resistencia a los análogos de nucleósidos y/o nucleótidos utilizados en el tratamiento de la hepatitis B.

Mutaciones del virus de la hepatitis B y su importancia clínica

Como se apuntó más arriba, el VHB se replica a través de un ARN intermediario (para lo cual se requiere de una transcriptasa inversa que carece de la capacidad de corrección de errores), por lo que presenta una tasa de mutación 10 veces más alta que otros virus de ADN. Esta elevada tasa de mutación conduce al surgimiento de variantes virales con implicaciones clínicas.

Mutaciones presentes en la región precentral y central

Como se mencionó anteriormente, esta región codifica para la proteína central y para el HBeAg. Estas dos proteínas contienen determinantes antigénicos potentes que evocan una respuesta inmune durante el mecanismo de eliminación viral. Existen dos grupos de **mutaciones** que afectan la síntesis del **HBeAg:** 1) las que se encuentran en la **región precentral,** y 2) las localizadas **en el promotor basal central**. Una explicación de la presencia de estas mutaciones es que la presión que ejerce el sistema inmune para erradicar el virus conduce al desarrollo de estas "**mutaciones de escape**"**,** lo que permite la sobrevivencia de las variantes del virus que no producen HBeAg (mutante precentral) o lo producen a niveles muy bajos, pero que aun con esas mutaciones el virus no pierde la capacidad de replicarse, y algunas veces lo hace con mayor eficiencia (mutaciones en el promotor basal central). Estas mutaciones se presentan en todos los genotipos, pero son más comunes en los genotipos asociados al desarrollo de cirrosis descompensada o con CHC, tales como el genotipo C.

Mutaciones en la región PreS/S

En zonas endémicas a la hepatitis B se ha encontrado la presencia de mutaciones de escape a la vacuna que alteran el HBsAg. En general, una sustitución de un aminoácido glicina por una asparagina en la posición 145 del HBsAg es suficiente para que los anticuerpos que se generan en respuesta a un virus silvestre o a la vacuna, no detecten este antígeno. Por tanto, la presencia de estas mutaciones puede dar como resultado una prueba serológica negativa para la detección del HBsAg (hepatitis B oculta) y una mala respuesta a la vacuna. El aminoácido 145 del HBsAg se encuentra dentro del **determinante "a"**, nombre que se le dio a los aminoácidos localizados de la posición 99 a la 170 del HBsAg. Este determinante representa el principal blanco inmune de los anticuerpos dirigidos contra este antígeno, ya sea por una infección activa o en respuesta a la vacuna.

En pacientes con hepatitis B oculta también se han encontrado mutaciones en las regiones Pre-S1 y Pre-S2, con presencia de deleciones o mutaciones sin sentido en el codón de inicio de pre-S2 (que afecta a la síntesis de la proteína mediana de envoltura).

Evaluación del paciente con hepatitis B

La evaluación de un paciente con diagnóstico de hepatitis B debe dirigirse al monitoreo de la actividad de la enfermedad

y al conocimiento de su evolución según lo que se conoce de la historia natural de la hepatitis B, con el objeto de evaluar de forma adecuada el tratamiento y/o manejo del paciente. Además de la historia médica y la evaluación clínica, se requiere el diagnóstico serológico, bioquímico y molecular como prueba virológica, para confirmar el diagnóstico; también se requieren estudios de imagen para continuar con el monitoreo del paciente. La biopsia hepática, aunque no es necesaria en todos los casos, puede ser muy útil para aportar un pronóstico de la enfermedad y para ofrecer un seguimiento adecuado en los pacientes seleccionados para tratamiento. La frecuencia del monitoreo clínico en el paciente debe determinarse según la actividad y el estadio de la enfermedad. La búsqueda dirigida al desarrollo del carcinoma hepatocelular debe basarse en la edad, el sexo, la raza, la historia familiar, la duración, la actividad y el estadio de la enfermedad. En la cuadro 24-3 se especifican los estudios de imagen y de laboratorio recomendados por el consenso de los National Institutes of Health, en la primera visita de un paciente con diagnóstico de hepatitis B.

Diagnóstico serológico

El diagnostico de la hepatitis B se lleva a cabo mediante la **detección del HBsAg, principal marcador serológico** de escrutinio en la hepatitis B. La presencia de este marcador puede detectarse tanto en la etapa aguda de la infección como en la etapa crónica. El **marcador serológico** específico de una **hepatitis B aguda** es el anticuerpo de tipo M, dirigido contra la proteína central del VHB (**IgM-anti-HBc**). La presencia del **HBeAg** en suero indica que hay una **elevada replicación viral en el hígado**. La **"seroconversion del HBeAg" se asocia a una mejoría clínica de la hepatitis** (reducción del ADN viral, niveles normales de ALT e inflamación leve en hígado). Esta mejoría clínica también se acompaña de la seroconversión del HBsAg (HBsAg negativo/anti-HBs positivos). La presencia de los **anti-HBs,** en ausencia del resto de marcadores serológicos del VHB, indica que la persona ha sido **vacunada contra el virus** o que fue infectada pero con altas probabilidades de haber eliminado al virus. En el cuadro 24-2 se muestra la relación del diagnóstico serológico y molecular (carga viral) con la hepatitis aguda, infección resuelta, inmunización y las tres fases de la historia natural de la hepatitis crónica mencionadas anteriormente.

Diagnóstico molecular

Se dispone de cuatro tipos de ensayos moleculares para el diagnóstico y manejo de la hepatitis B: 1) detección de la carga viral, mediante pruebas cuantitativas; 2) determinación de los genotipos; 3) pruebas de resistencia antiviral, para detectar mutaciones, y 4) pruebas de detección de mutaciones en la región del promotor central y la región precentral. Las pruebas que determinan la carga viral del VHB en sangre periférica (suero o plasma) son las utilizadas con más frecuencia. Las otras pruebas son muy especializadas, por lo que su uso es más limitado.

Detección de la carga viral

Es fundamental en la evaluación inicial de la hepatitis B crónica y durante su manejo, en particular para tomar la decisión de iniciar el tratamiento y su monitoreo. Los ensayos de carga viral altamente sensibles son importantes en el diagnóstico de pacientes con carga viral baja, tales como los que tienen hepatitis crónica y son negativos al HBeAg, así también como aquellos con hepatitis B oculta. Uno de los aspectos fundamentales es la sensibilidad analítica de la prueba molecular (cantidad mínima de ADN que es capaz de detectar) y el rango dinámico (lo mínimo y máximo que se detecta). Si esto se desconoce y no se analiza el tipo de prueba que se lleva a cabo, entonces, dependiendo de la carga viral, pueden perderse resultados valiosos en pacien-

Cuadro 24-3. Estudios de imagen y de laboratorio en la visita inicial del paciente con hepatitis B.

Antígeno de superficie del VHB (HBsAg)
Antígeno e del VHB (HBeAg) y su anticuerpo (anti-HBe).
ADN-VHB.
Anticuerpo IgM del VHB contra el antígeno core (IgM-anti-HBc) (si se sospecha de hepatitis B aguda).
Pruebas bioquímicas de rutina, incluyendo alanina y aspartato aminotransferasas (ALT, AST, respectivamente), fosfatasa alcalina (FA), creatín fosfocinasa (CPK), lactacto deshidrogenasa (LDH), bilirrubina total y directa, albúmina, proteínas totales, nitrógeno ureico en sangre y creatinina.
Biometría hemática incluyendo plaquetas.
Tiempo de protrombina.
Niveles de inmunoglobulinas.
Alfa fetoproteína.
Anticuerpos contra los virus de las hepatitis A, C y D (anti-VHA y anti-VHD) y contra el virus de la inmunodeficiencia humana (anti-VIH).
Ultrasonido abdominal.

Cuadro 24-4. Pruebas comerciales cuantitativas para determinar el ADN-VHB.

Prueba	Método	Sensibilidad analítica		Rango dinámico	
		UI/ml	Copias/ml	UI/ml	Copias/ml
PCR en tiempo real (Abbott)	PCR en tiempo real	4		$9–4 \times 10^9$	
Captura de híbridos II (Digene)	Captura de híbridos		1.9×10^5	19	$1.9 \times 10^5–1.7 \times 10^9$
Ultrasensible captura de híbridos II (Digene)	Captura de híbridos		8×10^3		$8 \times 10^3–1.7 \times 10^9$
Artus VHB PCR (QIAGEN Diagnostics)	PCR en tiempo real			$54–3.6 \times 10^9$	
COBAS Amplicor HBV (Roche Diagnostics)	PCR cuantitativo semiautomatizado		2×10^2		$2 \times 10^2–2 \times 10^5$
COBAS TaqMan HBV (Roche Diagnostics)	PCR en tiempo real		35		$1.7 \times 10^2–8.5 \times 10^8$
VERSANT HBV ADN 3.0 (Siemens Medical Solutions Diagnostics)	ADN ramificado		3.3×10^3		$3.3 \times 10^3–1.0 \times 10^8$

Los valores determinados pueden variar un poco según la técnica de extracción de ácidos nucleicos que se utilice.

tes que se encuentran en los extremos de la carga viral. En el cuadro 24-4 se muestran las pruebas que existen comercialmente y sus principales características.

Determinación de los genotipos

Las pruebas moleculares para la determinación del genotipo son útiles, ya que el genotipo podría influir en el resultado de la hepatitis B crónica y el éxito del tratamiento antiviral.

Pruebas de resistencia antiviral

Se dispone de pruebas comerciales que, detectan la resistencia a los antivirales mediante PCR e hibridación de ácidos nucleicos. Sin embargo, en la mayoría de casos estas pruebas no son de rutina y sólo se realizan en protocolos de investigación. Para el seguimiento del tratamiento de la hepatitis B de rutina se mide la carga viral, ya que un aumento de 10 veces en dicha carga puede indicar la presencia de una mutación que confiere resistencia al antiviral en uso. La detección de mutaciones de resistencia antiviral es muy valiosa en la decisión del fármaco que se va a utilizar como tratamiento, ya que hay mutaciones del VHB que presentan reactividad cruzada con diferentes antivirales; esto es, la misma mutación afecta a la eficacia de diferentes fármacos. Así, por ejemplo, la mutación rtL180M presente en el dominio de transcriptasa inversa de la polimerasa viral, que en la posición 180 cambia una Leu por una Met, crea una resistencia del virus al tratamiento con lamivudina y telvivudina, y disminuye el efecto del entecavir.

Pruebas de detección de mutaciones en el promotor central y la región precentral

Estas pruebas se llevan a cabo en pacientes con hepatitis crónica negativos al HBeAg y se aplican sólo en proyectos de investigación. En un futuro próximo estas pruebas podrán ser muy útiles en el tratamiento, el pronóstico y la evolución clínica de la hepatitis B.

Consideraciones finales

A pesar de los avances desarrollados en el conocimiento de la hepatitis B, que han llevado a una disminución de casos de CHC, así como a un incremento en el promedio y la calidad de vida de los pacientes infectados, todavía se requiere mayor número de estudios, en diferentes razas, dirigidos a entender más a fondo la asociación de los aspectos genéticos del virus y del hospedero, enfocados al conocimiento de la fisiopatología de la hepatitis B y al desarrollo de nuevos fármacos más adecuados para erradicar esta infección.

Preguntas de repaso

1. ¿Cuáles son los aspectos moleculares que explican una tasa de mutación intermedia entre un virus de ADN y uno de ARN en el VHB?
2. ¿Por qué se diseñó la vacuna del VHB con el HBsAg recombinante?
3. Por medio de la carga viral, ¿qué parámetro sugiere el surgimiento de una mutación de resistencia a los análogos de nucleótidos?

Bibliografía

Degertekin B., Hussain M., Tan J., Oberthelman K., Lok AS. Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v.3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance. *J Hepatol,* 2009;50(1):42-48.

Chien-Jen C., Hwai-IY, Uchenna H. The REVEAL-HBV Study Group. Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology,* 2009;49:S72-S84.

Fattovich G., Bartolotti F., Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis in disease progression and prognostic factors. *J Hepatol,* 2008;48:335-352.

Feld J., Lee J., Locarnini S. New targets and possible new therapeutic approaches in the chemotherapy of chronic hepatitis B. *Hepatology,* 2003;38(3):545-553.

Jinlin H., Zhihua L., Fan G. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Int J Med Sci,* 2005;2(1):50-57.

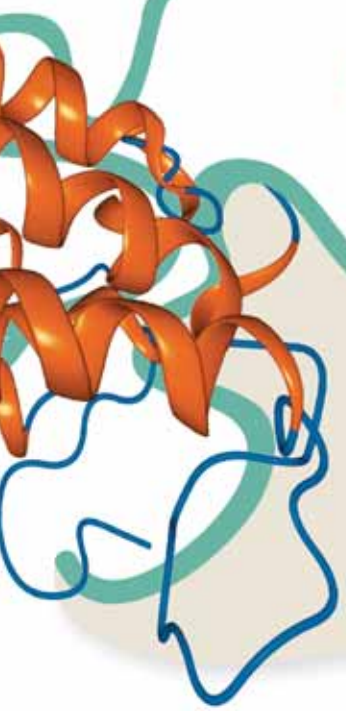
Norder H., Couroucé A.M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K., *et al.* Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology,* 2004;47:289–309.

Pawlostsky J.M., Dusheiko G., Hatzakis A., Lau D., Lau G., Liang T.J, *et al.* Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology,* 2008;134:405-415.

Sánchez L.V.,.Yasuhito T., Maldonado M., Mizokami M., Panduro A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of Mexican patients with different risk factors – high prevalence of genotype H and G. *Intervirology,* 2007;50:9-15.

Tatematsu K., Tanaka Y., Kurbanov F., Sugauchi F., Mano S., Maeshiro T., *et al.* A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol,* 2009;83(20):10538-10547.

Yaron R., Thomas A.B., Jay H.H. Evaluation of the patient with hepatitis B. *Hepatology,* 2009;49:S22-S27.



Capítulo 25

Bases moleculares de la hepatitis C

Laura Verónica Sánchez Orozco / David A. Fernández Galindo
Miriam Bueno Topete / Juan Armendáriz Borunda

Introducción

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus de ARN pequeño, encapsulado, que presenta tropismo hepático y que causa hepatitis aguda y crónica en humanos. En el mundo existen 200 millones de personas afectadas y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 3% de la población mundial está crónicamente infectada por este virus. La gran mayoría de los pacientes infectados permanecen asintomáticos durante la fase aguda y son incapaces de eliminar el virus, lo que provoca que cientos de miles de pacientes mueran cada año por complicaciones crónicas de la enfermedad, tales como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (CHC). A la fecha no existe vacuna para prevenir la infección, y el tratamiento más adecuado para combatirla es caro, presenta efectos secundarios adversos, no es adecuado para todos los sujetos infectados y sólo es efectivo en aproximadamente 50% de los pacientes tratados. Una de las limitaciones en el avance del conocimiento de la hepatitis C es que se carece de modelos animales pequeños para su estudio, dado que este virus sólo infecta al chimpancé y al ser humano. Sin embargo, el desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* está generando un gran avance en el conocimiento relacionado con la replicación del virus y con el desarrollo de nuevas terapias antivirales.

Epidemiología mundial de la hepatitis C

En el mundo existen alrededor de 200 millones de personas afectadas por el VHC. La prevalencia varía según la región: es más alta en el norte de África y Oriente Medio, principalmente Egipto, donde se ha reportado una prevalencia de 14%; le sigue el resto de África (3%), China y otros países asiáticos (2.1%), Europa oriental y Estados Unidos (1.6%). En países del norte de Europa, como Reino Unido, se reporta una prevalencia de 1.1%. En México, aunque no se dispone de estudios realizados en una población representativa, y según los reportes existentes, la mayoría realizados en donadores de sangre, la prevalencia de hepatitis C es de alrededor de 0.4%.

Vías de transmisión

La forma más común de infección por el VHC es el contacto directo con sangre y productos sanguíneos contaminados. La disponibilidad de terapias inyectables y drogas ha tenido una influencia notable en la epidemiología de VHC.

Consumo de drogas por vía intravenosa (DIV). En países desarrollados, como Estados Unidos, el uso de DIV es el principal factor de riesgo, a pesar de que se ha observado una disminución en el número de casos. La prevalencia de hepatitis C en usuarios que tenían un año consumiendo DIV disminuyó a 10% en el periodo de 1997 a 1998, mientras que durante 1988 a 1991 la prevalencia reportada fue de 65%.

Inyecciones y transfusiones de productos sanguíneos no seguras. En los países con prevalencia elevada, la mayoría de las infecciones se adquieren por no contar aún con medidas seguras de transfusión sanguínea, por la administración de inyecciones con jeringas no desechables y el uso inadecuado de material de curación cortante en consultorios médicos y dentales.

Contacto sexual. De los casos con hepatitis aguda reportados en Estados Unidos, 15 a 20% de los pacientes se reportan como factor de riesgo en la actividad sexual de alto riesgo (más de dos parejas sexuales durante un periodo de seis meses o tener relaciones con personas infectadas). Sin embargo, estudios de prevalencia realizados en parejas monogámicas en donde uno de ellos está infectado con el VHC sugieren que el contagio de la hepatitis C por contacto sexual es raro.

Transmisión perinatal. La transmisión a recién nacidos de madres infectadas varía de 4.6 a 10%. La única característica maternal asociada a la transmisión de la hepatitis C al recién nacido es la presencia del ARN viral en las madres

durante el tiempo del parto. No se han observado diferencias en la transmisión de la hepatitis C dependiendo de la forma de liberación del recién nacido (parto o cesárea).

Transmisión a personal de la salud y en prácticas de salud. En países desarrollados no es común observar la transmisión de paciente a paciente y, cuando se detecta, ésta está relacionada con prácticas inadecuadas de curación, tales como el uso de viales multidosis, limpieza inadecuada de equipo y falta de técnicas de asepsia. La transmisión del VHC de pacientes infectados al personal de salud se presenta principalmente por accidentes con agujas contaminadas.

Características estructurales del VHC

El VHC pertenece a la familia *Flaviviridae* y es el único miembro del género *Hepacivirus*. Existen seis genotipos (1 a 6) identificados según su secuencia de ácidos nucleicos, con una divergencia en su genoma completo de 30 a 50%; existen, además, más de 70 subgenotipos (a, b, c, d, etc.), identificados por diferencias en la comparación del genoma de 20 a 25% entre los genotipos. El término *quasiespecies* se refiere a la mezcla de variantes genéticas del VHC en un mismo individuo. De los genotipos identificados, el más resistente al tratamiento es el genotipo 1.

El VHC es un virus de ARN de cadena sencilla, con sentido positivo, que se replica mediante una ARN polimerasa dependiente de ARN. Su principal órgano de replicación es el hígado; sin embargo, se dispone de evidencia de reservorios extrahepáticos para el VHC, tales como linfocitos B de sangre periférica, células epiteliales en el intestino y el sistema nervioso central. Las partículas virales, analizadas en el microscopio electrónico, se observan de forma heterogénea: tienen al menos dos tamaños (50 y 100 nm de diámetro), y contienen doble pared y proyecciones en forma de pico en su superficie. En la figura 25-1 se muestra un esquema con los componentes estructurales de la partícula del VHC.

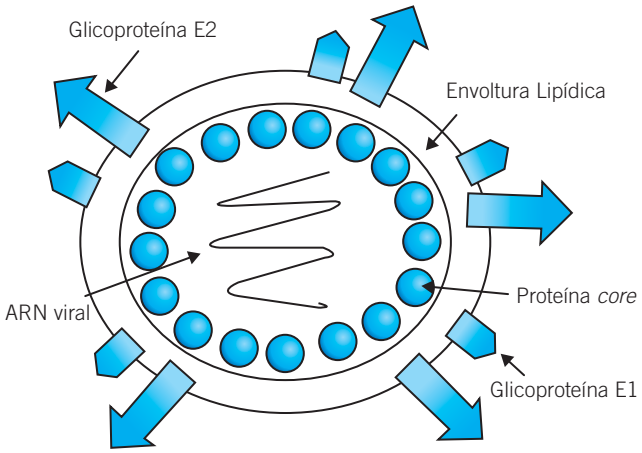


Figura 25-1. Esquema representativo del virus de la hepatitis C. El virus de la hepatitis C está constituido por una envoltura lipídica, un *core* y un genoma ARN.

Cuadro 25-1. Proteínas del virus de la hepatitis C y su función.

Proteína	Función
Central	Une al ARN viral y forma la nucleocápside.
E1	Envoltura. Fusión.
E2	Envoltura. Unión con receptor.
P7	Canal iónico.
NS2	Autoproteasa en unión con NS3.
NS3	En unión con NS2 autoproteasa. Helicasa.
NS4A	Cofactor de la NS3 autoproteasa.
NS4B	Unida a membrana de retículo endoplásmico, participa en la formación del complejo viral de replicación.
NS5A	Formación del complejo de replicación.
NS5B	ARN polimerasa.

Como se mencionó anteriormente, el genoma del VHC está formado por un ARN de cadena sencilla positiva de aproximadamente 9.6 kb, y contiene un marco de lectura abierta (MLA) que codifica para una poliproteína precursora de aproximadamente 3 000 aminoácidos. Esta poliproteína, al ser fragmentada mediante la acción de proteasas virales y del hospedero, genera al menos 10 proteínas diferentes: tres estructurales, la proteína central, E1 y E2; una proteína integral de membrana p7, y seis proteínas no estructurales, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, que coordinan los procesos intracelulares del ciclo de vida del VHC (cuadro 25-1).

Virus de la hepatitis C, sus proteínas y genes

El ARN del VHC carece del sitio 5'cap, y su traducción depende de un sitio interno de entrada al ribosoma (*internal ribosome entry site*, IRES), que se localiza en la región 5'-no codificante (5' NCR). El IRES se une a la subunidad 40S del ribosoma. Una vez iniciada la traducción del genoma del VHC, se produce una larga poliproteína mediante el ataque proteolítico mediado por proteasas del huésped y del virus, y se obtienen las proteínas estructurales y no estructurales del virus. La organización del genoma viral tiene la misma estructura que la poliproteína, con la diferencia de la presencia de las regiones no codificantes que se encuentran en los extremos 5' y 3' (5'-RNC y 3'-RNC, respectivamente) del genoma viral (figura 25-2).

Proteínas estructurales

Proteína central

La proteína central del VHC contiene una elevada proporción de aminoácidos básicos, característica que le permite

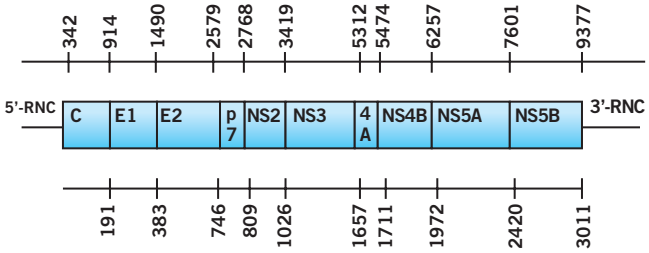


Figura 25-2. Organización lineal del genoma del virus de la hepatitis C. El VHC codifica, al menos, 10 proteínas por medio de un marco de lectura abierta que da lugar a una poliproteína precursora que es fragmentada en diversas proteínas estructurales y no estructurales. En la línea superior se especifica la posición del ribonucleótido, y en la línea inferior al aminoácido que da lugar al inicio de cada proteína viral.

su unión al ARN viral que da lugar a la formación de la nucleocápside.

Glucoproteínas de la envoltura

Las glucoproteínas de la envoltura E1 y E2 son proteínas transmembranales tipo I que forman heterodímeros no covalentes que forman los bloques que construyen la envoltura viral y participan en la entrada del virus a la célula.

P7

Es un polipéptido de 63 aminoácidos, dentro de la poliproteína viral se localiza en la parte de unión de las proteínas estructurales y no estructurales. P7 contiene dos dominios transmembranales que forman hexámeros con actividad de canal iónico. Se desconoce si P7 se ensambla en las partículas virales.

Proteínas no estructurales

NS2/3 autoproteasa

En la poliproteína viral, la unión de NS2/3 se hidroliza por medio de su actividad de autoproteasa que se localiza en el NH-terminal de NS3; este proceso es indispensable para la replicación del virus. La proteína NS2 derivada de la rotura de NS2/3 se inserta en la membrana del retículo endoplásmico y participa en la fosforilación de la proteína viral NS5A, evento indispensable para la replicación viral.

NS4A y NS4B

NS4A es un polipéptido de 54 aminoácidos que funciona como cofactor de la serina proteasa localizada en el dominio NS3.

NS4B es una proteína muy hidrofóbica de 27 kDa que se integra en la membrana del retículo endoplásmico. Esta proteína induce una alteración en la membrana, conocida como red membranosa, que sirve como sitio para la formación del complejo viral de replicación.

NS5A y NS5B

NS5A es una metaloproteína fosforilada, que contiene cinc como metal, y participa en la replicación viral, así como en el proceso del ensamblaje de la partícula viral. Los estudios de cristalografía de la proteína sugieren que forma una estructura que favorece la unión del ARN viral y el complejo de replicación.

NS5B es la polimerasa viral; es una ARN polimerasa dependiente de ARN que promueve la síntesis de nuevos genomas de ARN. Durante la replicación el ARN viral de cadena positiva se utiliza como molde para la síntesis de una hebra de ARN complementaria intermediaria de sentido negativo, que a su vez sirve de molde para la síntesis de nuevos ARN virales de cadena positiva.

Replicación del virus de la hepatitis C

Al igual que en todos los virus de ARN de cadena positiva, el VHC forma un complejo de replicación asociado a membrana, compuesto de proteínas virales, ARN viral, membranas celulares alteradas y factores del huésped.

La glucoproteína E2 se une con elevada afinidad a CD81, proteína que se encuentra en la superficie de muchos tipos de células, incluyendo los hepatocitos. Sin embargo, además de E2 y CD81, se requieren más moléculas para la entrada del VHC a la célula, entre las que se encuentran el receptor clase B tipo I (SRB1), que regula el metabolismo del colesterol. Este receptor en conjunto con las lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoproteins*, HDL) desempeñan un papel muy importante al inicio de la infección por el VHC. La proteína viral E1 se considera que participa en la fusión del virus con la membrana en la cara citoplasmática. El receptor de lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoproteins*, LDL) y de los glucosaminoglucanos, el heparán sulfato también participa en la entrada del VHC al hepatocito.

Una vez que el VHC entra a la célula, la nucleocápside es liberada al citoplasma, donde el ARN viral funciona como molde en dos eventos importantes de la replicación: 1) la traducción de la poliproteína, y 2) la replicación del ARN viral. Durante la traducción se produce la poliproteína precursora, la cual se procesa en las proteínas estructurales (C, E1, E2, P7) y no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B), mediante el ataque proteolítico de las proteasas del huésped y las virales. La replicación del ARN viral de cadena positiva se lleva a cabo en un compartimiento membranoso en el citoplasma de la célula y da lugar a un ARN de cadena negativa, formando ARN de doble cadena que funciona como intermediario para la nueva formación de ARN viral de cadena positiva. Estos procesos permiten el ensamble de las proteínas estructurales del virus con el ARN viral para formar nuevas partículas virales, que son liberadas de la célula mediante exocitosis (figura 25-3).

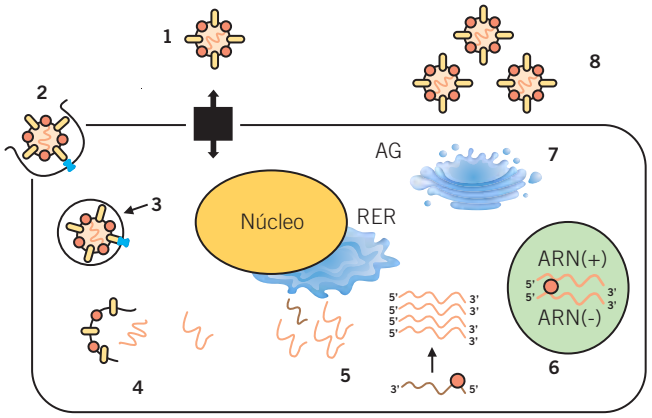


Figura 25-3. Ciclo de vida del VHC. 1) Unión de glucoproteínas virales con receptores de membrana celular. **2)** Fusión de membranas. **3)** Entrada viral al interior de la célula. **4)** Pérdida de la nucleocápside viral. **5)** Síntesis de proteínas virales en el retículo endoplásmico rugoso (RER). **6)** Replicación viral en el citoplasma. **7)** Encapsulación en membranas de ARN viral en el aparato de Golgi (AG). **8)** Liberación de virus.

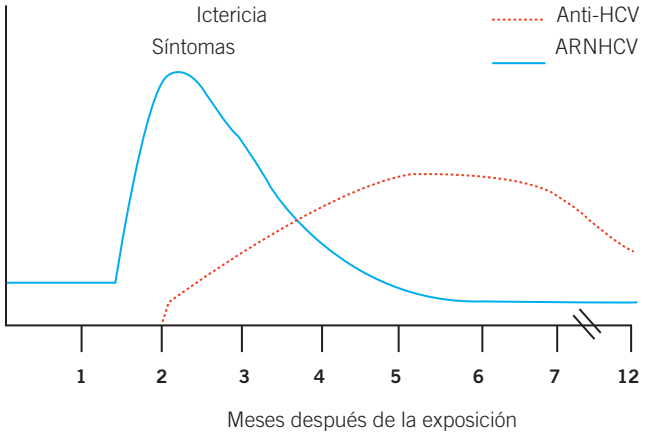


Figura 25-4A. Evolución de la infección por el virus de la hepatitis C.
A) La hepatitis C aguda se caracteriza por un pico notorio de ARN viral a la semana 6, junto con el inicio de los síntomas; a este mismo tiempo se elevan los niveles de anti-VHC que en general son detectables entre el tercer y el cuarto mes, y existe una disminución notoria en los niveles de ARN viral hasta hacerse indetectables entre el quinto y el sexto mes. **B)** La hepatitis C crónica muestra un curso variable; es frecuente el inicio más temprano de los síntomas y oscilaciones en la carga viral.

Historia natural de la hepatitis

Hepatitis C aguda

La mayoría de los pacientes que se infectan con el VHC no presentan un cuadro de hepatitis aguda. La infección aguda por el VHC raramente es sintomática (15%). Durante la evolución de la hepatitis C aguda, pueden distinguirse cuatro fases: la primera se caracteriza por la no detección o detección intermitente de concentraciones muy bajas del ARN-VHC circulante; aproximadamente dos semanas después, le sigue una fase corta de ocho a 10 días, en la cual hay un incremento rápido de la carga viral circulante; la tercera fase se caracteriza por una etapa estacionaria en los niveles circulantes del ARN viral, con una duración de alrededor de 40 a 60 días; por último, la cuarta fase se caracteriza por la detección de los anticuerpos anti-VHC, una disminución de la carga viral o el avance a un estado crónico de la enfermedad en la mayoría de los pacientes infectados. La presencia de anticuerpos se detecta generalmente en la novena semana; sin embargo, hay casos en los que se ha reportado que tardan en aparecer hasta un año después de la primera detección de la viremia (figura 25-4A). Aproximadamente, 15 a 40% de los pacientes expuestos al VHC elimina la infección en seis meses.

Hepatitis C crónica

La mayoría de las personas infectadas con el VHC evolucionan a cronicidad. Estudios realizados en donantes de sangre, personas que han recibido productos sanguíneos, usuarios de DIV y mujeres jóvenes que recibieron inmunoglobulina D contaminada muestran que de 55 a 86% de las personas infectadas por el VHC evolucionan a cronicidad. Para establecer el diagnóstico se requiere la detección de ARN VHC por más de seis meses (figura 25-4B).

En pacientes crónicos, la evolución de la enfermedad es variable y no todos desarrollan complicaciones hepáticas como cirrosis o CHC. Estudios realizados en pacientes que

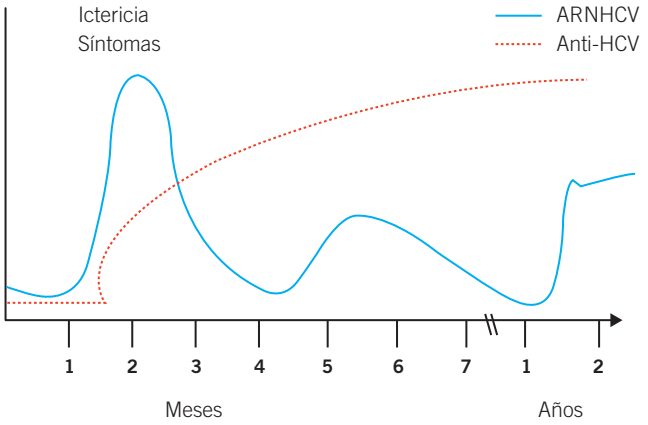


Figura 25-4B. Evolución de la hepatitis C. A) La hepatitis C aguda se caracteriza por un pico notorio de ARN viral a la semana 6, junto con el inicio de los síntomas; a este mismo tiempo comienzan a elevarse los niveles de anti-VHC que en general son detectables en el tercer o cuarto mes. Existe una disminución notoria en los niveles de ARN viral hasta hacerse indetectables entre el quinto y sexto mes. **B)** La hepatitis C crónica muestra un curso variable; es frecuente el inicio más temprano de los síntomas y oscilaciones en la carga viral.

acuden a clínicas de hígado muestran que de 18 a 26% de estos sujetos presentan complicaciones hepáticas, tales como cirrosis, en aproximadamente 20 años posteriores a la fecha de infección, porcentaje que es menor en los estudios realizados en donantes de sangre, en los que esta complicación sólo se presenta entre 4 y 7% de estos individuos a los 20 años posinfección.

De los pacientes que desarrollan cirrosis, la probabilidad de presentar enfermedad hepática descompensada es de 4% por año. En pacientes con fibrosis avanzada, cada año 7% evoluciona a CHC.

Diagnóstico molecular de la hepatitis C

La infección por el VHC a menudo se subdiagnostica, y hasta 50% de las personas con infección por este virus no son conscientes de su enfermedad. Por esto, las técnicas moleculares (cuadro 25-2) se utilizan como herramienta clave en el diagnóstico y el monitoreo del tratamiento para la infección por el VHC. El ARN viral puede detectarse en el suero, el hígado y las células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados con hepatitis aguda, crónica, cirrosis y CHC. La detección del ARN viral en suero se considera el indicador más sensible y específico de replicación viral e infectividad para el VHC, y es esencial para la confirmación del diagnóstico serológico e ***imprescindible*** para el seguimiento del paciente en tratamiento. Las pruebas que se utilizan para determinar la presencia del ARN viral se clasifican en cualitativas y cuantitativas, y son muy sensibles y específicas.

Las pruebas cualitativas documentan la presencia o ausencia de virus en sangre; de estas pruebas, la más utilizada es la retrotranscripción (RT) seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). De esta prueba se dispone de varios kits comerciales; en general, la sensibilidad es de 96% y la especificidad de 99%, y tienen un límite de detección muy sensible, de cerca de 50 UI/ml. Además de confirmar la viremia, estas pruebas son muy útiles en la búsqueda del VHC en donadores de productos sanguíneos, lo cual aumenta la prevención y disminuye el contagio de este virus, ya que en la mayor parte del mundo se utilizan los mismos anticuerpos; por otro lado, tienen la desventaja de presentar un amplio periodo de ventana.

Las pruebas cuantitativas documentan el número de copias de ARN viral en unidades internacionales por mililitro (UI/ml) (carga viral). La conversión de la UI a copias/ml varía según el equipo comercial que se utilice, pero oscila en un rango de 0.9 a 5.2 copias/ml. Se dispone de varias pruebas cuantitativas, que se fundamentan en la PCR en tiempo real, que puede cuantificar con precisión los niveles de ARN viral en un rango lineal que supere los seis logaritmos. Estas pruebas se utilizan, sobre todo, en el monitoreo terapéutico.

Determinación del genotipo viral

Como ya se comentó anteriormente, el VHC se clasifica en seis genotipos y varios subgenotipos. Es clínicamente importante realizar el diagnóstico molecular de estos genotipos, ya que predicen la probabilidad de respuesta al tratamiento, dictan su duración y muchas veces determinan la dósis del fármaco que se tiene que emplear. El genotipo es el predictor de respuesta al interferón y ribavirina más fuerte. Para la determinación del genotipo viral existen dos métodos comerciales: uno se basa en la técnica de secuenciación de ácidos nucleicos en la región 5' NC del virus (*TrueGene* 5'NC HCV *genotyping kit)*, y el otro se lleva a cabo mediante una RT-PCR, seguido de una hibridación inversa, utilizando sondas específicas de genotipo que se unen en la región 5'NC (*Versant HCV genotype Assay LiPA*).

Una vez que se conoce la carga viral, el genotipo viral y todos los factores clínicos y de laboratorio que evalúan el efecto del VHC en el deterioro de la función hepática, pueden establecerse los criterios de tratamiento en el paciente.

Tratamiento de la hepatitis C

Ya que la mayoría de pacientes infectados por el VHC permanecen asintomáticos durante la fase aguda, los que acuden a recibir el tratamiento son predominantemente pacientes con daño hepático crónico. El objetivo del tratamiento es lograr una respuesta virológica sostenida (RVS), esto es, eliminación de la carga viral por lo menos durante seis meses posteriores a la conclusión del tratamiento. En la actualidad, no se dispone de una terapia antiviral selectiva ni de una vacuna preventiva. El tratamiento inicial para hepatitis C consistía en la monoterapia con interferón α (IFN-α). Los resultados tuvieron una mejoría considerable cuando se modificó químicamente la molécula de IFN-α con el uso de polietilenglicol, conocido como IFN pegilado (PEG-IFN). Con esta modificación se incrementó la vida

Cuadro 25-2. Guías para el uso de pruebas de ácidos nucleicos para la detección del virus de la hepatitis C.

Situación clínica	Prueba
Sospecha de infección aguda.	RT-PCR cualitativa o RT-PCR en tiempo real
Sospecha de infección crónica (anti-VHC positivo).	RT-PCR cualitativa o RT-PCR en tiempo real
Anti-VHC negativo, inexplicable enfermedad hepática o inmunocomprometido.	RT-PCR cualitativa o RT-PCR en tiempo real
Anti-VHC y ARN-VHC positivos, elegibles para tratamiento.	RT-PCR cuantitativo y determinación del genotipo viral
Hijo nacido de madre con anti-VHC positivo.	RT-PCR cualitativo o RT-PCR en tiempo real

media del compuesto, lo que le permite permanecer en circulación sanguínea durante días y ser activo. Esta mejoría en la biodisponibilidad del IFN *in vivo* y la adición de la ribavirina al tratamiento logró una mejoría de más de 100% en la RVS comparada con el IFN-α no pegilado. Aun con estos cambios, que lograron una mejoría considerable en el tratamiento para la hepatitis C, es importante señalar que únicamente alrededor de 50% de los pacientes tratados logran una RVS. El genotipo del VHC desempeña un papel muy importante en la respuesta y la velocidad de una RVS al tratamiento, y alrededor de 50% de pacientes con genotipo 1 desarrolla una RVS favorable comparada con más de 80% de aquellos con genotipos 2 o 3 que responden de forma favorable.

Aún no se ha llegado a establecer el mejor tratamiento para la infección aguda por VHC, pero en varios estudios se han observado buenos resultados con el uso de 5 MUI de IFN diario, por cuatro semanas, seguido por 5 MUI tres veces por semana por 20 semanas, con este esquema se ha demostrado RVS en más de 95% de los pacientes. Lo más importante de esto es que, durante la infección aguda por VHC, el genotipo y los niveles séricos de ARN parecen no tener influencia en el tratamiento. Para el tratamiento de la infección crónica por VHC las guías recomiendan PEG-IFN más 1 000 a 1 200 mg de ribavirina por 48 semanas para los genotipos 1 o 4, y PEG-IFN más 800 mg de ribavirina por 24 semanas para genotipo 2 o 3, con lo que se ha demostrado RVS de 55 y 80%, respectivamente.

De los que no responden al tratamiento y continúan con enfermedad hepática crónica, pueden evolucionar con graves consecuencias, tales como el desarrollo de CHC o presentar una descompensación hepática. La opción para estos pacientes podría ser un trasplante hepático; sin embargo, se ha observado que si éstos presentan una infección activa por el VHC durante el trasplante, se produce un aumento de 10 veces en la carga viral en relación con los niveles presentados antes del procedimiento. De los que desarrollan cirrosis después del trasplante, alrededor de 40% presentará descompensación hepática y sólo 50% de estos pacientes logrará sobrevivir un año después de la descompensación.

En la actualidad, se encuentran en desarrollo nuevos fármacos, que inhiben específicamente un sitio en el ciclo de vida de VHC; virtualmente, puede inhibirse cada paso de este ciclo. Además, con el uso de tecnología de biología molecular y del ADN recombinante se ha llegado a la producción de moléculas que podrían interferir con la síntesis viral, como las ribozimas y el ADN de interferencia, aunque esto todavía está en investigación *in vitro*.

Preguntas de repaso

1. ¿Qué proteína del VHC interactúa con el receptor CD81 para ingresar al hepatocito?
2. ¿Cómo se determina que una hepatitis C evolucionó a cronicidad?
3. En pacientes con hepatitis crónica, ¿cuáles son los genotipos del VHC más resistentes para desarrollar una respuesta virológica sostenida?

Bibliografía

A diagnosis of hepatitis C- Insights from a study on patients' experiences. *Aust Fam Phys*, 2010;(8).

Alter M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, 2007;13:2436-2441.

Asselah T., Bieche I., Paradis V., Bedossa P., Vidaud M., Marcellin P. Genetics, genomics, and proteomics: implications for the diagnosis and the treatment of chronic hepatitis C. *Sem Liver Dis*, 2007;27(1).

Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat*, 1999;6:35-47.

Irving W.L., Brow R.J.P. Acute hepatitis C virus infection: a dynamic—and challenging—concept. *JID*, 2010:202(12):1765–1767.

Narahari S., Juwle A., Basak S., Saranath D. Prevalence and geographic distribution of Hepatitis C Virus genotypes in Indian patient cohort. *Infect Genet Evol,* 2009;9:643-645.

National Institutes of Health. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology*, 2002:36(Suppl 1):S3-S20.

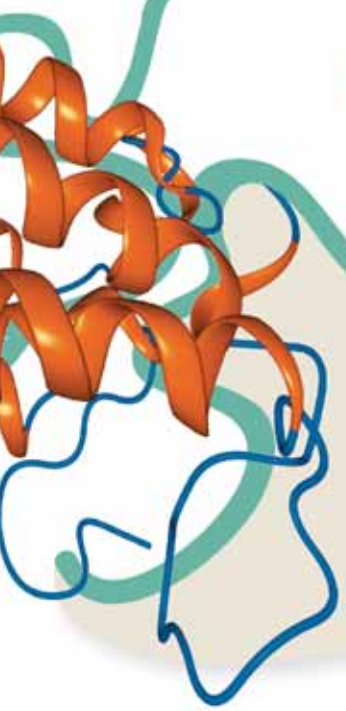
Pawlotsky J.M., Chevaliez S., Mchutchison J.G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*, 2007;132:1979-1998.

Thomson M., Nascimbeni M., Gonzales S., Murthy K.K., Rehermann B, Liang TJ. Emergence of a distinct pattern of viral mutations in chimpanzees infected with a homogeneous inoculum of hepatitis C virus. *Gastroenterology*, 2001;121:1226–1233.

Tsubota A., Fujise K., Namiki Y., Tada N. Peginterferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, 2011;17(4):419-432.

US Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. *MMMWR Recomm Rep*, 1998;47:1-39.

Scott J.D., Gretch D.R. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA*, 2007;297(7):724-732.



Capítulo 26

Bases moleculares del virus de la inmunodeficiencia humana

Martha Escoto Delgadillo / Carlos Mata Munguía
Eduardo Vázquez Valls

Introducción

Los virus se clasifican en más de 60 familias, según el tipo de ácido nucleico que contengan, en la información que albergue su genoma y en la cantidad y el tipo de genes que presenten. Entre estas familias, al menos 20 infectan a los humanos. El agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) es un retrovirus que se conoce como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Lentivirus*.

El VIH se identificó por primera vez en Francia en 1983 por Luc Montagnier, y es un virus con genoma ARN que induce infección celular crónica por la conversión de su ARN a ADN proviral, que se integra en el genoma de la célula infectada e induce daño progresivo al sistema inmune del huésped. La infección por este lentivirus se caracteriza por una progresión lenta, con largos periodos de latencia clínica, seguido por la aparición de signos y síntomas graduales, como fiebre, linfadenopatía, enfermedades oportunistas, síndrome de desgaste, y enfermedades oncológicas y crónicas degenerativas.

Una de las principales características del VIH es su variabilidad genética, que muestra durante su evolución la transmisión de fragmentos genómicos de virus de simio al humano y que han dado origen a varios tipos, subtipos, variantes y múltiples formas recombinantes.

Otro factor que participa en la variabilidad genética es la alta tasa de mutación del genoma del virus, dada por la enzima transcriptasa inversa. Esta enzima carece de actividad exonucleasa en el proceso de replicación y genera 3×10^{-5} mutaciones por nucleótido por ciclo y una producción de 10^{10} partículas virales por día. Considerando estas dos variables, se estima que en promedio pueden generarse 3×10^{9} mutaciones por día en la población viral de cada persona con VIH. La mayoría de las mutaciones que se generan en las variantes tienen poco o nulo efecto en la función viral o en la capacidad de replicación, e incluso otras pueden ser letales para el virus. Sin embargo, cuando estas mutaciones se ubican en sitios genómicos clave como por ejemplo en genes de las enzimas virales, afectan a la capacidad del virus o pueden conferir resistencia a uno o varios antirretrovirales.

Otro factor que contribuye a la diversidad genética es la recombinación de las dos cadenas de ARN, que constituye una parte intrínseca del ciclo normal de replicación viral y puede mediar la reparación de genomas virales defectuosos, incrementar la diversidad viral o acelerar la propagación de mutaciones benéficas entre las cuasiespecies virales.

La variabilidad genética impacta en la pandemia del VIH a través del diagnóstico, la patogenia, la progresión y la transmisión de la enfermedad, la cuantificación de la carga viral, el manejo clínico, la respuesta al tratamiento antirretroviral y el diseño de una vacuna.

Historia natural de la enfermedad

Los diferentes estados clínicos de la infección por el VIH son producto de alteraciones en el balance entre el estado inmunológico y el virológico. El estado inmunológico se determina por el conteo de los linfocitos $TCD4^+$ y se expresa como células/mm^3. El estado virológico se determina por el número de copias de ARN del VIH (carga viral) y se expresa como copias/ml. Son características de la infección la destrucción gradual de la población de linfocitos T $CD4^+$ y la producción constante de nuevas partículas virales, lo que genera una inmunodeficiencia gradual que lleva al paciente al último estadio de la infección por el VIH o sida.

Los pacientes infectados por el VIH atraviesan por tres estadios clínicos (figura 26-1):

1. Infección primaria o fase aguda: seroconversión.
2. Estado asintomático o latencia clínica.
3. Estado sintomático o sida.

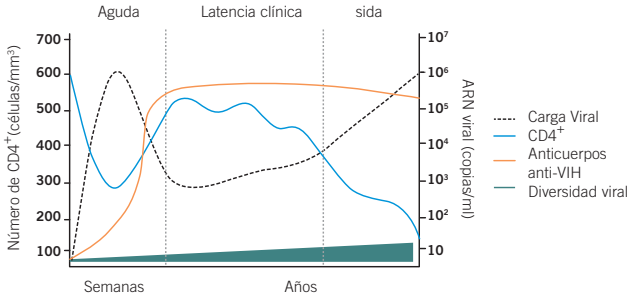


Figura 26-1. Historia natural de la infección. La infección primaria se caracteriza por los niveles altos de ARN viral, los recuentos de células T CD4+ bajos y la ausencia de anticuerpos específicos contra el VIH. Durante la latencia clínica, la viremia baja y los linfocitos se restablecen, para descender con el transcurso del tiempo acompañado de un aumento moderado pero continuo de la carga viral y conducir a un colapso del sistema inmune asociado a la progresión a sida. La diversidad genética viral aumenta en función del transcurso de la enfermedad.

Infección primaria

Este periodo inicia con la infección del paciente y puede no tener ninguna manifestación clínica, ya que sólo es sintomática en aproximadamente 40-80% de los pacientes después de dos a tres semanas de haberse infectado. Los síntomas pueden variar, y pueden incluir fiebre, mononucleosis, erupción maculopapular, dolor de garganta, malestar general y dolor de articulaciones. Los signos y síntomas desaparecen en dos o tres semanas; posteriormente, el paciente es asintomático entre seis y 10 años.

Los primeros episodios que ocurren después de que el VIH atraviese la barrera de la mucosa se conocen como periodo de ventana, durante el cual la producción de anticuerpos IgM e IgG no es suficiente para que las pruebas diagnósticas detecten la respuesta inmunológica en contra de la presencia del VIH. La duración es controversial, aunque históricamente se ha sugerido que tarda aproximadamente tres meses. Debido a la naturaleza inespecífica de los síntomas durante esta etapa, el diagnóstico de la enfermedad por el VH rara vez se reconoce en la práctica médica.

Entre dos y seis semanas después de la infección, la carga viral en el plasma llega a centenas de miles de copias/ml. Debido al aumento masivo de la replicación viral, el número de células T CD4+ disminuye. En consecuencia, la carga viral elevada también contribuye a la transmisión de la enfermedad. Se ha estimado que hasta 30% de los contagios por el VIH se transmiten durante la fase aguda.

Entre las cuatro y las 12 semanas a partir de la infección inicial aparecen los anticuerpos IgG específicos contra el VIH y se activa la respuesta inmune celular específica, causa principal del descenso de la carga viral y del correspondiente aumento en el recuento de linfocitos T CD4+ y la seroconversión del paciente (figura 26-1).

Alrededor de seis a 12 meses tras la infección se alcanza y se mantiene un equilibrio entre la cantidad de partículas virales producidas y eliminadas y el número de linfocitos T CD4+ destruidos y generados cada día.

Fase asintomática

La mayoría de los pacientes se diagnostican en esta fase, a pesar de la ausencia de síntomas tempranos. Durante esta etapa persiste una replicación viral alta y el número de partículas virales que se producen alcanzan más de 10^{10} partículas por día. Estas partículas se contrarrestan por la capacidad de regeneración de los linfocitos T CD4+; sin embargo, no son suficientes para detener, en definitiva, la progresión de la enfermedad. Con el uso adecuado del tratamiento antirretroviral, que inhibe la replicación del virus en distintas etapas del ciclo de replicación viral, es posible la reconstitución del sistema inmune, lo que prolonga la aparición de los síntomas de sida y aumenta la cantidad y la calidad de vida de las personas que viven con el VIH. La duración de esta fase asintomática, también llamada crónica, es variable y depende de muchos factores tanto del virus como del individuo infectado. En 80 y 90% de los pacientes esta etapa dura entre 8 y 10 años (figura 26-1).

Etapa sintomática o sida

El continuo desgaste del sistema inmune por la pérdida de los linfocitos T CD4+ incrementa la susceptibilidad de adquirir diversas infecciones. En esta etapa se produce un aumento de la actividad de replicación viral, y el sistema inmunológico ya no es capaz de frenarla. Clínicamente, cuando la cuenta de linfocitos CD4+ disminuye a < 200 células/mm^3, los pacientes son más susceptibles de presentar infecciones oportunistas que le pueden conducir a la muerte. Neoplasias como el sarcoma de Kaposi, tuberculosis, neumonía, candidiasis y ciertos trastornos neurológicos son algunas infecciones características de la etapa de sida. La duración de esta fase es desfavorable, con una supervivencia inferior a 15 a 30% a los tres años. Ya en este estado de la enfermedad, el sistema inmune está muy comprometido y aunque el paciente reciba tratamiento antirretroviral, eventualmente morirá (figura 26-1).

Clasificación del VIH

La epidemiología molecular del VIH es un tema complejo que está en constante evolución, debido a la alta variabilidad genética inherente a este retrovirus. El VIH se originó en África occidental y central, por la transmisión de múltiples zoonosis de los virus de la inmunodeficiencia de los simios y de primates no humanos a los humanos.

Existen varias hipótesis que explican la transmisión entre los primates y los humanos; las más aceptadas son: a) el proceso de caza y matanza de los primates para consumo de la carne; b) la exposición directa de los humanos a la

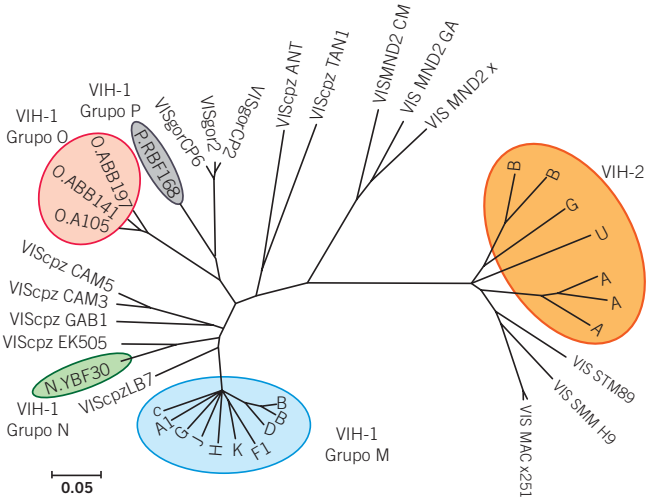


Figura 26-2. Relación filogenética del VIH y VIS (virus de la inmunodeficiencia de los simios). Se construyó el árbol filogenético con las secuencias consenso del gen *pol* del VIH y VIS. Para mayor claridad las FRC se excluyeron del análisis. Las secuencias se analizaron con Clustal W y el árbol se construyó con el programa Mega con el método *Neighbor-Joining con bootstrap* 1 000 replicados.

sangre o secreciones de las mucosas de los animales, y c) la contaminación en la preparación de la vacuna oral contra la poliomielitis.

La clasificación del VIH se elabora según los patrones de agrupamiento por similitud genética. Hasta la fecha se han identificado dos tipos de VIH: el VIH-1 y el VIH-2 (figura 26-2).

VIH-1

A través de numerosos análisis filogenéticos de las cepas del VIH, aisladas en diversas zonas geográficas del mundo, el virus se ha clasificado en cuatro categorías: grupos, subtipos, sub-subtipos y formas circulantes recombinantes.

Existen cuatro grupos del VIH-1, transmitidos de manera independiente del chimpancé y el gorila al humano, denominados M, N, O y P (figura 26-2). Los grupos M y N tienen relación filogenética con los virus encontrados en el chimpancé (*Pan troglodytes troglodytes*), mientras que los grupos O y P, con los hallados en los gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*).

Los grupos se denominan "M" por *main*, o principal, "O" por *outlier* y "N" por *non-M, non-O*. La nomenclatura para clasificar las cepas del VIH se propuso en 1999, y desde entonces se acordó que a los nuevos grupos se les asignaría una letra por estricto orden alfabético, tal es el caso del recientemente descrito grupo P.

El grupo M incluye las cepas responsables de la pandemia alrededor del mundo, y se subdivide en nueve subtipos (A-D, F-H, J y K) (figura 26-2). Los subtipos A y F se subdividen sub-subtipos (A1, A2, F1 y F2). Conforme se encuentren nuevos subtipos, también se les denominará por orden alfabético.

Cuando, mediante el análisis filogenético, algunas cepas se agrupan con distintos subtipos en diferentes regiones de sus genomas, a estos genomas mosaicos se les denomina *formas recombinantes circulantes* (FRC), que se forman cuando en la misma región geográfica cocirculan varios subtipos que infectan a un individuo y generan virus recombinantes con información genética de dos subtipos diferentes (figura 26-3). En la actualidad se han descrito 52 FRC que se identifican con los números y con las letras de los subtipos que están involucrados. Cuando se recombinan más de tres subtipos, se denominan *cpx* (complex) y se clasifican en el orden en que se describieron.

En el mundo, el subtipo C representa 48% de las infecciones, seguido de los subtipos A, B, G y D, que suponen 12, 11, 5 y 2% de las infecciones, respectivamente. Las FRC representan, por lo menos, 20% de las infecciones por el VIH en el mundo. En México predomina el subtipo B y las formas recombinantes intersubtipo BF y BG.

No están muy claros todos los efectos que tienen los subtipos sobre la progresión de la enfermedad, pero se ha demostrado que el subtipo D progresa más rápido que el A.

El grupo N está formado por secuencias filogenéticas muy relacionadas, ya que sólo se ha descrito en muy pocos individuos de Camerún.

El grupo O se encontró originalmente en la región centrooccidental de África e, igual que el grupo M, la diversidad de sus secuencias es elevada. Se clasifica en las clases I-V, que son genéticamente distantes entre ellas como los

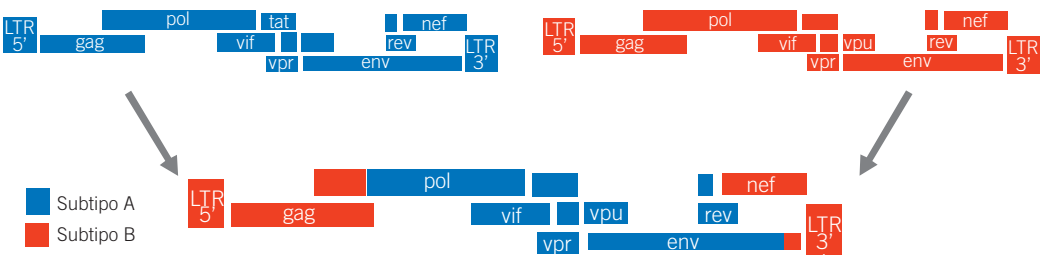


Figura 26-3. Representación esquemática de la formación de FRC. Estructuras de mosaico del genoma de las formas recombinantes circulantes del VIH. Las letras y los colores representan los diferentes subtipos del VIH-1 que lo componen. Se muestra la FRC03-AB.

subtipos del grupo M; sin embargo, no se han propagado en todo el mundo.

El grupo P se describió recientemente, y sólo se dispone de un par de secuencias en individuos originarios de Camerún.

VIH-2

El VIH-2 presenta una relación cercana con el virus de inmunodeficiencia en simios aislado de sooty mangabey (*Cercocebus aty*). Se divide en grupos de A a H.

Este virus es endémico de África occidental, y los estudios filogenéticos demuestran que los diversos grupos de este virus se originaron por transmisiones independientes entre el sooty mangabey y los humanos.

Genoma viral

El genoma del VIH consta de aproximadamente 10 kb, y está compuesto por nueve genes: tres estructurales, que son característicos de los retrovirus; dos reguladores, y cuatro accesorios. Además, en los extremos cuenta con repeticiones terminales largas (*long-terminal repeat,* LTR), que funcionan como regiones promotoras para la transcripción del virus (figura 26-4).

Las proteínas estructurales son necesarias para la síntesis de nuevas partículas virales, y los genes que codifican para estas proteínas son *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para las proteínas de la cápside (p24, p17, p9 y p7). p24 forma la nucleocápside; p17 forma la matriz del virus y se encuentra entre le envoltura externa del virus y la nucleocápside, y p7 y p9 están estrechamente asociadas con el ARN viral. El gen *pol* codifica para las tres enzimas esenciales del ciclo de replicación viral: la enzima transcriptasa inversa (p66)/ARNasa H, la integrasa (p31) y la proteasa. El gen *env* codifica para la proteína precursora de la envoltura y se procesa por una proteasa celular en dos proteínas de envoltura: gp120, que se encuentra en la superficie del virus, y gp41, una proteína transmembranal. Este complejo de glucoproteínas es el que une al receptor celular (figura 26-4).

Los genes reguladores son *tat* y *rev*, cuyas proteínas no se ensamblan en el virus, pero son esenciales para la replicación viral dentro de la célula. La función de la proteína Tat es regular la transcripción del promotor viral, y la de la proteína Rev, ayudar al transporte eficiente del ARN viral del núcleo al citoplasma. En ausencia de Rev no se forman las proteínas estructurales (figura 26-4).

Los genes accesorios están involucrados en la regulación de la expresión de genes virales y en la latencia celular. Estos genes son: *nef, vif, vpr, vpu* y *vpx*. Los genes *nef, vif* y *vpr* se encuentran en todos los retrovirus a excepción del SIVagm, que no contiene *vpr*. El VIH-1 contiene *vpu*, mientras que el VIH-2, *vpx* (figura 26-4). El gen *nef* codifica para una proteína que se requiere para una replicación viral eficiente, interactúa con componentes de la célula huésped y se asocia con elevadas cargas virales. La proteína Nef tiene, al menos, dos funciones distintas: mejora la replicación viral y estimula una reducción en el número de receptores celulares CD4 en la superficie de la célula infectada, función que sirve para prevenir reinfecciones. Otra función biológica de Nef es la regulación de la molécula MHC-1 en las células infectadas, que enmascara al sistema inmune. La proteína Vif influye en las partículas virales que se encuentran libres y sean infecciosas. La proteína Vpr tiene múltiples funciones durante la replicación viral en células que no están en división: tiene efectos en el proceso de transcripción inversa, en la importación del complejo de preintegración del ADN viral y en la regulación de la apoptosis e interviene en los genes de la célula huésped. La proteína Vpu sólo se encuentra en el VIH-1, facilita la liberación de las partículas virales, interviene en el retículo endoplásmico en las señales para la expresión del receptor celular CD4, está involucrado en la maduración de las proteínas de la envoltura y no se encuentra en el virión; sin esta proteína las partículas virales permanecen unidas a la membrana celular. Por último, el gen *vpx* es exclusivo del VIH-2 y tiene funciones similares a la proteína Vpr del VIH-1, pero sin detener el ciclo celular. Esta proteína se asocia a la patogenia del virus porque en su ausencia se desarrolla sida.

Estructura del virión

El VIH pertenece a un grupo de virus isométricos y mide entre 90 y 140 nm de diámetro. Como otros retrovirus, la partícula viral del VIH está compuesta por la proteína de la cápside (p24), la de la nucleocápside (p7/p9), dos cadenas de ARN de cadena simple y tres enzimas: proteasa, transcriptasa inversa e integrasa (figura 26-5).

La envoltura del virus está compuesta de lípidos, que son derivados de la célula huésped, y espículas virales, codi-

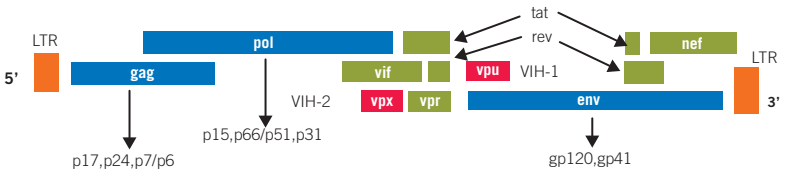


Figura 26-4. Genoma del VIH. Formado por tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) y dos genes reguladores (*tat* y *rev*), junto con cuatro genes accesorios, tres de éstos son comunes para ambos tipos de virus (*vif*, *vpr*, *nef*) y el cuarto es específico, *vpu* para el VIH-1 y *vpx* para el VIH-2.

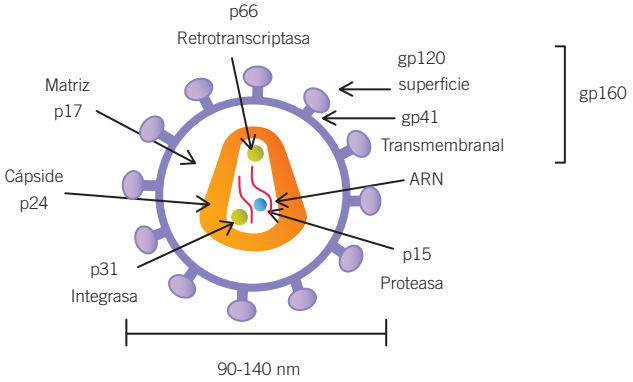


Figura 26-5. Estructura del VIH. La nucleocápside de la parte central contiene dos copias del genoma viral, proteínas del núcleo y las enzimas. La envoltura que la rodea está compuesta de lípidos que son derivados de la célula huésped y glicoproteínas virales (gp120 y gp41).

ficadas por el virus. Posee cerca de 70 espículas sobre la envoltura lipídica, que consisten de una molécula transmembranal, la glucoproteína 41 que actúa no covalentemente con la gp120 (glucoproteína exterior). Debajo de la envoltura del virión se encuentra la proteína de la matriz (p17), que delimita la membrana externa de la cápside interna (figura 26-5).

La partícula madura del VIH contiene una cápside interna ribonucleoproteica formada por las proteínas p24 y p7/p6. Dentro de la cápside se encuentran las enzimas transcriptasa inversa/ARNsa H, integrasa y proteasa; además, contiene dos copias de ARN de cadena simple unidas mediante enlaces no covalentes (figura 26-5).

Ciclo de replicación del VIH

Como otros retrovirus, el VIH necesita replicarse dentro de una célula blanco, utilizando su maquinaria celular. El virus inicia el ciclo de infección con la unión de la partícula viral a células con receptor $CD4^+$, y las células susceptibles de infectarse son los linfocitos T cooperadores, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas, de la microglia y megacariocitos.

La partícula viral se adhiere a la célula con la interacción de la glucoproteína gp120 de la envoltura del virus con el receptor de superficie celular $CD4^+$. Esta unión produce cambios conformacionales en ambos receptores, lo que permite un acercamiento más estrecho entre ellos y lleva al virus a una segunda unión con el correceptor celular (CCR5 o CXCR4). Esta segunda interacción genera un nuevo cambio conformacional en la gp41, lo que provoca que se forme un poro de fusión, unión que ocasiona cambios en la membrana celular y la envoltura del virus, lo que permite su fusión (figura 26-6). Como consecuencia, al degradarse parcialmente la cápside, se libera el contenido de la partícula viral (entre otros componentes las dos hebras de ARN y la enzima transcriptasa inversa) en el citoplasma de la célula.

El siguiente paso en la replicación involucra la transcripción inversa, donde el ARN viral se transcribe en ADN proviral. La enzima transcriptasa inversa es la responsable de la síntesis de la primera cadena de ADN (ADNss[-]) y es complementaria a la cadena de ARN. Durante la síntesis de esta cadena, con frecuencia la transcriptasa inversa cambia de una cadena de ARN a la otra y genera una sola cadena de ADN con recombinación de las dos cadenas originales

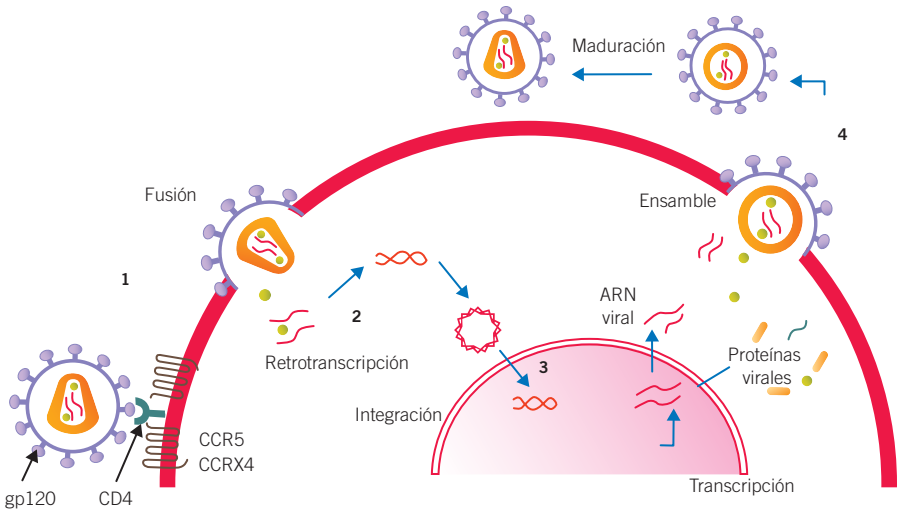


Figura 26-6. Ciclo de replicación del VIH y sus blancos terapéuticos. Después de la unión y fusión en la superficie de la membrana celular, la cápside central entra en el citoplasma. La transcriptasa inversa sintetiza una doble cadena de ADN que es transportada al núcleo, donde ocurre su integración, seguida de la expresión de los ARN virales y síntesis de las proteínas virales. Se ensamblan y liberan las nuevas partículas virales de la membrana celular. Los blancos terapéuticos virales son cuatro: **1)** inhibidores de entrada (antagonistas del CCR5 e inhibidores de fusión); **2)** inhibidores de la transcriptasa inversa (análogos de los nucleósidos/nucleótidos y no-análogos de los nucleósidos); **3)** inhibidores de la integrasa, y **4)** inhibidores de la proteasa.

de ARN viral. La actividad ARNsa H de la enzima degrada el ARN cuando éste ya se ha sido copiado.

Subsecuentemente, el ADNss(-) sirve como templado para sintetizar la segunda hebra deADN y forma el complejo de preintegración que se transporta vía retículo endoplásmico, y con ayuda de la proteína viral Vpr, al núcleo celular, donde será integrado al genoma de la célula huésped. Con la participación de la enzima integrasa, el complejo de preintegración atraviesa la membrana nuclear y, junto con enzimas reparadoras del huésped, integra el genoma viral en el cromosoma de la célula huésped, generando el genoma proviral (figura 26-6).

La transcripción del genoma proviral se regula por los genes *tat* y *rev*. La proteína Tat ayuda a la elongación de ARN y Rev regula la transportación del ARN del núcleo citoplasmático. El ARN se une a los ribosomas e inicia la síntesis de proteínas virales y estas proteínas se transportan para ensamblarse cerca de la membrana de la célula. Las proteínas estructurales de los genes *gag, pol* y *env* se expresan como poliproteínas, que son cortadas por la proteasa del virus hasta convertirlas en unidades funcionales más pequeñas. Los productos del gen *env* son transportados a la membrana celular y el empaquetamiento del ARN requiere de las señales del gen *gag*. Las proteínas de envoltura viral se unen dentro de la membrana de la célula huésped, junto con las proteínas que forman el *core* del virus, las dos hebras ARN y las enzimas. Finalmente, la liberación de las nuevas partículas virales interviene el gen *vpu*. El virus pincha la célula y libera nuevos virus fuera de la célula, donde, gracias a la proteasa, el virus sigue madurando (figura 26-6). La capacidad de infección del virus depende de la maduración de éste y del gen *vif*. Una sola célula puede producir miles de partículas infecciosas del VIH durante semanas o en una sola explosión tras la muerte de la célula infectada.

Diagnóstico serológico y molecular

Después de la exposición al virus, en general desde la segunda a la tercera semanas, los eventos virológicos y serológicos muestran una viremia elevada, lo que provoca la distribución del virus a todo el organismo. El ARN del VIH está presente antes de que el paciente desarrolle anticuerpos detectables anti-VIH.

La proteína de la cápside central del virus, el antígeno p24 (Ag p24), usualmente puede detectarse a los pocos días de la aparición de la viremia. Cuando el sistema inmune del huésped inicia una respuesta para controlar la infección, los niveles tanto del virus como del Ag p24 disminuyen hasta ser indetectables. En general el Ag 24 permanecerá indetectable hasta que el sistema inmune se desgaste, y se asocia con la progresión de la enfermedad.

El conocimiento de estos acontecimientos virológicos y serológicos que ocurren después de la infección permite diagnosticar la infección por el VIH por cualesquiera de las técnicas.

Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de la infección por el VIH se basa en pruebas de laboratorio. Los métodos de diagnóstico se pueden clasificar en dos grupos:

1. Indirectos: detectan la presencia de anticuerpos específicos que el organismo produce como respuesta. En este grupo se encuentran las pruebas de tamizaje, como el análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay,* ELISA) y la prueba confirmatoria (Western blot).
2. Directos: detectan el virus o algunos de sus componentes (cultivo viral, reacción en cadena de la polimerasa, PCR).

La prueba más frecuente es el ELISA; sin embargo, para diagnosticar la infección por el VIH se requieren dos pruebas de ELISA positivas y una prueba confirmatoria también positiva.

ELISA

Estas pruebas detectan mínimas cantidades de anticuerpos, por lo que pequeñas cantidades de sustancias similares podrían conducir a resultados falsos positivos (vacuna contra la influenza, hepatitis B y rabia); que también son causados por estimulación del sistema inmune (infecciones virales, embarazo, enfermedades autoinmunes, transfusión de sangre, etc.). Para confirmar un resultado positivo, en general se realiza una prueba de inmunoelectrotransferencia (Western blot). La reacción se lleva a cabo en una placa de plástico con pozos microtitulados. La superficie de cada cavidad está cubierta por los anticuerpos y antígenos del VIH. A continuación, al pozo se le agrega suero o plasma del paciente y si en el suero existen anticuerpos específicos, éstos se unen al complejo de antígeno de la placa. Después se añade un anticuerpo secundario marcado que se va unir al complejo que se formó entre los anticuerpos presentes en el suero y los antígenos localizados en la placa. Por último, se agrega un sustrato cromógeno, que reacciona con el anticuerpo marcado con la enzima. Esta unión resulta en un cambio de color que se mide en el espectrofotómetro. La densidad óptica se correlaciona con la concentración de anticuerpos del VIH presentes en el paciente: a mayor intensidad, más anticuerpos en el suero.

Pruebas rápidas

Las pruebas rápidas son métodos de detección de anticuerpos anti-VIH con resultados en menos de 30 minutos, con una sensibilidad y una especificidad con rangos desde 99.6 a 100%. Además de plasma y suero sanguíneo, en las pruebas rápidas se utiliza sangre total o capilar, que se toma del dedo o del lóbulo de la oreja; también, otros ensayos utilizan orina o trasudación oral (no saliva). Las pruebas rápidas se basan en métodos de inmunocromatográficos, aunque hay técnicas que utilizan aglutinación de partículas, inmunoDOT e inmunofiltración. Suelen emplear péptidos sinté-

ticos o proteínas recombinantes del VIH como fuente de antígeno, y consisten en una fase sólida compuesta de macropartículas que contienen los anticuerpos y el antígeno del VIH. Metodológicamente son menos complejas que los ELISA, y combinadas con otras pruebas de detección de anticuerpos constituyen una estrategia que mejora la especificidad de los resultados de forma asequible. Los resultados positivos siempre deben confirmarse con ELISA y Western blot.

Western blot

La técnica consiste en separar las proteínas virales (antígenos) por su peso molecular por medio de electroforesis, después son transferidas a una membrana de nitrocelulosa que se va utilizar como tira reactiva del ensayo. Esta tira se incuba con el suero o el plasma del paciente. Si en el suero existen anticuerpos anti-VIH, éstos se van a unir al antígeno que está presente en la tira reactiva. El complejo resultante (antígeno-anticuerpo) se hace visible utilizando un anticuerpo secundario y su sustrato correspondiente. Las bandas que se observan en la tira reactiva concuerdan con los anticuerpos presentes en la muestra.

A continuación se exponen las proteínas que pueden detectarse con esta prueba, que corresponden a los genes estructurales del VIH:

- Proteínas de la envoltura: gp160, gp41, gp120.
- Proteínas de la polimerasa: p31/p34, p39/p40, p51/p52, p66/p68.
- Proteínas de la nucleocápside: p17/p18, p24/p25, p55.

La formación de anticuerpos después de la infección sigue una cinética específica; por ejemplo, la p24 y la gp120 se detectan en fases tempranas mientras que la p31 por lo común se observa en fases tardías de la infección. Una prueba de Western blot se considera positiva cuando al menos son visibles dos o tres bandas.

Los criterios internacionales para determinar un resultado positivo no están definidos de manera uniforme, y son los siguientes:

- Organización Mundial de la Salud (OMS): dos glucoproteínas cualesquiera.
- Cruz Roja Americana: una proteína de cada gen estructural.
- Food and Drug Administration (FDA): p24+p32+(gp41 o gp120 o gp160).
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): p24 + (gp41 o gp120 o gp160) o gp41+ (gp120 o gp160).

Ensayos de detección de ARN del VIH

Aunque los ensayos con anticuerpos son el pilar en el diagnóstico de la infección por el VIH, los anticuerpos pueden permanecer indetectables durante las primeras tres a seis semanas después de la infección. La detección del ARN viral desempeña un papel importante en la infección temprana de la infección antes de que ocurra la seroconversión. En general, puede detectarse entre la primera y la segunda semanas después de la infección, cuando ni los anticuerpos ni el antígeno p24 son detectables. Esta clase de pruebas tiene la sensibilidad de detectar de 50 copias/ml en adelante. Estas pruebas no se han adaptado como herramientas de detección porque son costosas y técnicamente complejas para llevarlas a cabo.

El único ensayo aprobado por la FDA como ayuda al diagnóstico de la infección es el ensayo cualitativo de ARN (*aptimade gen-probe*). En resumen, se captura el ARN en una micropartícula magnética y, posteriormente, se amplifica para detectar por medio de una sonda quimioluminiscente.

Se recomienda en los bebés nacidos de madres positivas para el VIH, pacientes con un riesgo elevado de adquirir la infección y que presenten síntomas que sugiera la infección, así como en pacientes con infección aguda. La infección aguda por el VIH se define como niveles detectables de ARN viral en plasma con resultados de anticuerpos negativos o indeterminados.

El desarrollo de los ensayos para cuantificar los niveles de ARN del VIH (carga viral) en plasma ha revolucionado el manejo clínico de la infección por el VIH. Aunque estas pruebas cuantitativas desde hace varios años existen, no están aprobadas para el diagnóstico de la infección, ya que en pacientes positivos para el VIH, pero con niveles bajos de ARN, pueden dar un resultado falso negativo.

Los pacientes con infección por el VIH diagnosticados con ensayos de detección de ARN viral deben practicarse un examen serológico para confirmar la seroconversión.

Ensayos de seguimiento

Durante el periodo de latencia clínica asociada a la infección por el VIH el virus continúa replicándose. Este periodo termina con el desarrollo de síntomas de la enfermedad. El conocimiento de los factores que afectan la progresión de la enfermedad ayuda al manejo integral de la infección por el VIH. Se ha demostrado la relación entre alta cantidad de ARN del VIH y la disminución de la cantidad de linfocitos T $CD4^+$ con la rápida progresión de la enfermedad.

La cuantificación de la carga viral y el recuento de los linfocitos T $CD4^+$ proporcionan información pronóstica esencial para el médico. Las pruebas para medir la carga viral en los pacientes se utilizan para monitorear la eficacia del tratamiento antirretroviral, con la finalidad de mantener la carga viral por debajo de los niveles detectables, y en pacientes sin tratamiento antirretroviral, para evaluar si se requiere iniciarlo. Un aumento significativo y progresivo de la carga viral en el paciente indica el fracaso del tratamiento, pero no si es por falta de adherencia al tratamiento o por resistencia a los antirretrovirales. Para corroborar si el fracaso terapéutico es por resistencia a los antirretrovirales se realiza la prueba de genotipificación.

Cuantificación de los linfocitos T CD4+

Los linfocitos T CD4+ son fundamentales para desarrollar la respuesta inmune específica a las infecciones, en particular a los patógenos intracelulares. Puesto que estas células son el blanco del VIH, su disminución limita gravemente la capacidad de respuesta inmune del hospedero. La capacidad del sistema inmune de tener una respuesta específica contra el VIH es un factor clave en el curso de la enfermedad, y la cuantificación de las células CD4+ es el predictor más significativo de la progresión de la enfermedad. Recuentos bajos de linfocitos T CD4+ se asocian con mayor riesgo de progresión de la enfermedad, y la recomendación para iniciar tratamiento se basa en la cuenta de los linfocitos T CD4+ antes que en cualquier otro marcador.

El riesgo de progresión a sida aumenta sustancialmente cuando el recuento de los linfocitos T CD4+ es < 350 células/mm^3. El riesgo es mayor cuando los recuentos caen por debajo de 200 células/mm^3. Con este conteo se recomienda comenzar el tratamiento antirretroviral (200 a 350 células/mm^3).

El recuento de los linfocitos CD4+ se lleva a cabo por citometría de flujo, mediante anticuerpos fluoresceinados y cuenta el porcentaje de células CD4+.

ARN del VIH

La cuantificación de la carga viral del VIH se utiliza como marcador pronóstico para medir tanto para progresión de la enfermedad como la eficacia del tratamiento antirretroviral. Como se mencionó anteriormente, niveles elevados de carga viral se asocian a una disminución de los linfocitos T CD4+, lo que lleva a la progresión a sida y la muerte.

La guía define *fracaso virológico* como la situación en que no se logra una carga viral con niveles indetectables después de seis meses de tratamiento (< 50 copias/ml) o cuando se tiene una carga viral constante de > 50 copias/ml o > 400 copias/ml después de la supresión por debajo de este nivel.

En la actualidad están aprobados por la FDA cinco ensayos para cuantificar las copias de ARN del VIH/ml de plasma; dos son pruebas de RT-PCR, que son más sensibles y menos susceptibles a la contaminación. Una utiliza PCR estándar, otra con ADN ramificado, y por último, la otra utiliza amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA). Estas pruebas tienen sensibilidad mayor al 98%, detectan al grupo M del VIH-1, con excepción del RT-PCR tiempo real, que detecta los grupos M, N y O del VIH-1.

Pruebas de resistencia a los antirretrovirales

La resistencia se define como la disminución de la sensibilidad del fármaco antirretroviral. Es la principal causa de la falla al tratamiento y se genera por una serie de sustituciones en los genes que codifica para el receptor y las enzimas virales, blanco en los que actúan los antirretrovirales.

Las pruebas de resistencia determinan la secuencia de nucleótidos del genoma viral y sus resultados son una lista de cambios de aminoácidos o mutaciones que son diferentes a la cepa de referencia de tipo silvestre. Esas mutaciones se expresan por la posición que tienen en el genoma (codón), precedido por la letra que corresponde al aminoácido de tipo silvestre y seguido por el aminoácido que muestra la mutación, como por ejemplo la L90M, leucina del codón 90 que cambia a metionina.

En la actualidad existen más de 100 mutaciones involucradas en el desarrollo de resistencia a los antirretrovirales. Existen varios algoritmos tanto públicos (cinco) como privados (seis), que facilitan la interpretación del genotipo para determinar el nivel de resistencia a los antirretrovirales. Se dispone de cinco ensayos comerciales para determinar la resistencia, todos basados en obtener la secuencia de ARN viral para analizar las mutaciones en los genes en donde actúan los antirretrovirales que están disponibles a la fecha. La Asociación Internacional de SIDA y la guía para la atención médica de la Secretaría de Salud recomiendan el uso de estas pruebas bajo las siguientes circunstancias: a) infección aguda por el VIH en el momento del diagnóstico; b) fracaso del tratamiento antirretroviral, si la carga viral es > 1 000 copias/ml; c) en mujeres embarazadas, como profilaxis en la transmisión vertical, si en la madre se detecta ARN viral; d) respuesta subóptima a la terapia, cuando no se logra disminuir la carga viral en un periodo de ocho a 12 semanas, lo que sugiere la preexistencia de resistencia, y e) antes de iniciar tratamiento antirretroviral. En México, entre pacientes *naïve* a tratamiento ARV se encontró que 16% al menos presentaba resistencia a un antirretroviral; además, 7.3% mostró niveles de resistencia altos.

Terapia antiviral

Desde el descubrimiento del VIH, se han tratado de comprender los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el ciclo biológico del VIH, desde la interacción del virus con la célula hasta la liberación de las partículas virales. Con este conocimiento se han identificado los pasos críticos, que hoy son blancos terapéuticos y bloquean el ciclo de replicación viral. El tratamiento antirretroviral es la mejor opción para lograr la supresión viral por periodos prolongados, ya que la mantiene en niveles indetectables, y así aumentar los linfocitos CD4+ por el mayor tiempo posible, y en consecuencia reducir la mortalidad y la morbilidad; sin embargo, los tratamientos actuales no erradican la infección por el VIH. Inicialmente, la inhibición de la replicación del VIH se dirigió a las enzimas virales, que no están presentes en las células humanas y son exclusivas del virus. Los tratamientos actuales que inhiben la replicación del VIH abarcan la entrada del virus a la célula y bloquean la función de las tres enzimas virales. El uso del tratamiento antirretroviral altamente activo, y ha demostrado ser eficaz para retrasar la progresión a sida, al controlar la replicación viral por perio-

dos prolongados. En México se han aprobado 28 productos que contienen antirretrovirales con seis mecanismos de acción diferentes para el tratamiento en diferentes etapas del ciclo de infección por el VIH (cuadro 26-1).

- Inhibidores de entrada: hay dos clases de inhibidores:
  - Antagonistas del CCR5.
  - Inhibidores de fusión.
- Inhibidores de la transcriptasa inversa.
  - Análogos de los nucleósidos/nucleótidos de la transcriptasa inversa (ITIAN).
  - No análogos de los nucleósidos de la transcriptasa inversa (ITINN).
- Inhibidores de la integrasa.
- Inhibidores de la proteasa (IP).

Inhibidores de entrada

La entrada del VIH tiene una gran relevancia como blanco farmacológico. La entrada del virus se puede dividir en cuatro etapas: 1) el virus se fija a la superficie de la célula; 2) el virus se une a receptor $CD4^+$; 3) el complejo CD4-gp120 interactúa con los correceptores celulares, y 4) el virus se fusiona con la célula. Dentro de este grupo de antirretrovirales se incluyen los antagonistas del CCR5 y los inhibidores de fusión.

Antagonistas del CCR5

Después de la interacción de la gp120 con el linfocito CD4, ocurre un cambio conformacional que permite una interacción más cercana con alguno de los correceptores celulares CCR5 o CXCR4, para impulsar la fusión entre el virus y la célula. Los antirretrovirales de esta clase inhiben la unión del complejo gp120-CD4 con el correceptor CCR5 e interrumpen el ciclo de replicación del VIH. Los antagonistas del correceptor CCR5 se unen a su dominio transmembranal, lo que produce un cambio en el dominio extracelular del CCR5 que hace que la gp120 del VIH no lo reconozca. El antirretroviral aprobado de esta familia es el maraviroc.

Inhibidores de fusión

El único antirretroviral aprobado de esta clase de inhibidores es el enfurvitide. Cuando el complejo CD4-gp120-correceptor celular se une para el ingreso de la partícula viral a la célula huésped, induce cambios conformacionales en gp41. Estos cambios provocan que la región hidrofóbica de la parte central de la gp41 quede expuesta. En esta región se encuentra el *heapted repeat* (HR) 1 y el HR2, que están compuestas de seis hélices que forman una estructura de "horquilla" que crea el poro de fusión por donde la cápside viral pasa a la célula. El mecanismo de acción de esta clase de antirretroviral consiste en la unión competitiva a HR1

Cuadro 26-1. Antirretrovirales aprobados para el manejo de la infección por el VIH.

Antirretroviral	Aprobación		Blanco viral	Mecanismo de acción
	FDA	SSA		
Inhibidores de entrada				
Maraviroc (TPV)	2007	2008	Correceptor celular CCR5	Se une al correceptor CCR5, bloqueando la adhesión viral con la célula T $CD4^+$.
Enfuvirtida (T-20)	2003	2004	gp41 de la envoltura viral	Interfiere con la fusión de la membrana viral con la célula.
Inhibidores de la transcriptasa inversa				
Análogos de los nucleósidos/nucleótidos (ITRAN)				
Abacavir (ABC)	1998	1999	Transcriptasa inversa	Son activos cuando se trifosforilan. Los ITRAN son una versión modificada de los nucleósidos. Interrumpen la síntesis de ADN del VIH, al incorporarse durante esta etapa.
Didanosina (ddI)	1991	1996		
Emtricitabina (FTC)	2003	2005		
Estavudina (d4T)	1994	1998		
Lamivudina (3TC)	1995	1998		
Tenofovir (TDF)	2001	2005		
Zidavudina (AZT)	1987	1990		
No análogos de los nucleósidos (ITRNN)				
Delavirdina (DEL)	1997	–	Transcriptasa inversa.	Inhibidores que se unen al sitio activo de la enzima e impiden la transcripción y neoformación del ADN viral.
Efavirenz (EFV)	1998	1998		
Etravirina (ETV)	2008	2008		

para impedir los cambios conformacionales del complejo gp41-gp120, y evitar el acercamiento y la fusión entre el virus y la célula.

Inhibidores de la transcriptasa inversa

La enzima transcriptasa inversa se encarga de convertir el ARN viral en ADN de doble cadena, para formar el complejo de preintegración que después se llevará al núcleo de la célula. El sitio activo de esta enzima está altamente conservado y la sustitución de cualquier aminoácido disminuye su actividad enzimática asociada con la unión de los desoxinucleótidos (dNTP) y la elongación del templado. Existen dos clases de inhibidores de esta enzima: los análogos de los nucleósido/nucleótidos y los no análogos de los nucleósidos.

Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósido/nucleótidos

Los ITIAN son antirretrovirales que requieren ser trifosfatados por las cinasas celulares para ser activos. Una vez fosforilados compiten por los dNTP naturales, al incorporarse en la cadena de ADN en formación, bloquean la elongación y finalizan su síntesis. Los ITIAN no tienen el grupo 3' OH hidroxilo, y por tanto, previenen la formación del enlace fofodiéster de la cadena en crecimiento. En la actualidad, existen siete antirretrovirales de esta clase (cuadro 26-1).

Inhibidores de la transcriptasa inversa no-análogos de los nucleósidos

Los ITINN no requieren de activación celular y actúan directamente en el bloque de la actividad enzimática. Estos inhibidores se unen en el hueco hidrofóbico localizado cerca del sitio activo de la enzima, lo que causa un cambio debido al desplazamiento de la posición de los aminoácidos y la imposibilidad de la unión de la polimerasa. Los antirretrovirales de primera generación pertenecientes a este grupo (delavirdina, nevirapina y efavirenz) presentaban resistencia cruzada y una barrera genética baja, ya que con una mutación se generaba un grado elevado de resistencia. La segunda generación de los ITINN, como la etravirina y rilpivirina, muestran una barrera genética mayor y menores probabilidades de resistencia cruzada.

Inhibidores de la integrasa

La inserción del genoma viral en el ADN de la célula huésped se lleva a cabo mediante la enzima viral integrasa. La integrasa tiene dos funciones catalíticas: 1) forma el complejo de preintegración viral, ya que elimina un dinucleótido de cada extremo del ADN viral y luego se transporta a través del poro nuclear al núcleo; 2) dentro del núcleo, corta ambas cadenas de ADN de la célula e integra el ADN viral. A este proceso se le conoce como *transferencia de cadenas*. Las enzimas reparadoras de la célula huésped sellarán los espacios entre el ADN viral y el celular.

Los inhibidores de la integrasa, como el ealtegravir, buscan bloquear a esta enzima mediante la unión a su sitio catalítico, para evitar que se lleve a cabo el proceso de integración. En la formación del complejo de preintegración, la integrasa se adhiere a los extremos del ADN viral, y los inhibidores de esta enzima se adhieren a la integrasa. Este complejo se transporta al núcleo; sin embargo, con la presencia de los inhibidores, la integrasa ya no puede unir los extremos del ADN viral al ADN celular, lo que impide que se establezca la infección.

Inhibidores de la proteasa

La proteasa del virus tiene como función la de cortar la poliproteína que se forma como producto de la traducción del ARNm de los genes *gag, pol* y *env,* y transformarlas en proteínas funcionales o activas de la cápside interna, las enzimas esenciales y las glucoproteínas de la envoltura que se requieren para la producción de virus maduros. Los IP tienen una barrera genética muy alta y se unen al sitio activo de la enzima, lo que impide el ensamblaje de los viriones inmaduros y, por tanto, pierden su infectividad. En la actualidad existen nueve IP aprobados para su uso clínico (cuadro 26-1).

El desarrollo de resistencia a los antirretrovirales es la principal causa de la falla del tratamiento y se genera por una serie de sustituciones de nucleótidos en los genes que codifican para el receptor y enzimas virales, blanco en los que actúan los antirretrovirales.

La diferencia en el surgimiento de la resistencia a los antirretrovirales se explica por las barreras genéticas de los propios fármacos. Para los ITINN y la lamivudina (3TC), una sola mutación puede conferir resistencia y, en algunos casos, generar resistencia para todos los fármacos de esta misma clase. Para el resto de los ITIAN y los inhibidores de proteasa, el desarrollo de niveles altos de resistencia requiere de varias mutaciones (cuadro 26-2)

La continua replicación en presencia de antirretrovirales lleva a la acumulación de varias mutaciones y permite, con el tiempo, el desarrollo de resistencia cruzada dentro de una misma clase de antirretrovirales (cuadro 26-2). Cuando se requiere de múltiples mutaciones para conferir resistencia se dice que existe una barrera genética alta.

Cuadro 26-2 Antirretrovirales de la infección por el VIH y sus mutaciones de resistencia.

Antirretroviral	Mutaciones de resistencia*	Mecanismo de resistencia
Inhibidores de entrada		
Maraviroc	No hay consenso sobre las mutaciones de resistencia; se han identificado mutaciones en el bucle V3 de gp120.	No está establecida.
Enfuvirtide	G36DS, I37V, V38AME, Q39R, Q40H, N42T, N43D	Mutaciones en el dominio HR1 de gp41.
Inhibidores de la transcriptasa reversa		
Análogos de los nucleósidos/nucleótidos (ITRAN)		
Abacavir	K65R, L74V, T115F, M184V	Las mutaciones influyen tanto en el sitio de unión con los dNTPs como en el lugar de unión de la enzima a la plantilla iniciadora.
Didanosina	K65R, L74V	
Emtricitabina	K65R, M184VI	
Estavudina	M41L, K65R, D67N, K70R, L210W, T215YF, K219QE	
Lamivudina	K65R, M184VI	
Tenofovir	K65R, K70E	
Zidovudina	M41L, D67N, K70R, L210W, T215YF, K219QE	
Complejo de inserción 69	M41L, A62V, inserción, K70R, L210W, T215YF, K219QE	Generan resistencia a todos ITRAN.
Complejo 151	A62V, V75I, F77L, F116Y, Q151M	
TAMs	M41L, D67N, K70R, L210W, T215YF, K219QE	
No análogos de los nucleósidos		
Delavirdina	K103N, V106M, Y181C, Y188L, P236L	Las mutaciones disminuyen la afinidad del inhibidor por la enzima. Todas las mutaciones se localizan en el hueco de unión que abarca los codones 100-110 y 180-190. Una sola mutación puede generar altos niveles de resistencia.
Efavirenz	L100I, K101P, K103NS, V106M, V108I, Y181CI, Y188L, G190SA, P225H	
Etravidina	V90I, A98G, K100I, K101EHP, V106I, E138AGKQ, V179DFT, Y181CIV, G190SA, M230L	
Nevirapina	L100I, K101P, K103NS, V106AM, V108I, Y181CI, Y188CLH, G190A	
Rilpivirina	K101EP, E138AGKQR, V179L, Y181CIV, H221Y, F227C, M230IL	
Inhibidores de integrasa		
Raltegravir	E92Q, Y143RHC, Q148HKR, N155H	Probablemente cambio en la capacidad de la enzima para realizar sus funciones.

(*Continúa*)

Cuadro 26-2 Antirretrovirales de la infección por el VIH y sus mutaciones de resistencia. (*continuación*)

Antirretroviral	Mutaciones de resistencia*	Mecanismo de resistencia
Inhibidores de proteasa		
Atazanavir	L10IFCV, G16E, K20RMITV, L24I, V32I, L33IFV, E34Q, M36ILV, M46IL, G48V, I50L, F53LY, I54LVMTA, D60E, I62V, I64LMV, A71VITL, G73CSTA, V82ATFI, I84V, I85V, N88S, L90M, I93LM	Las mutaciones reducen la afinidad de la enzima; éstas se pueden encontrar cerca del sitio activo de la enzima o en aminoácidos fuera de la región activa. Para generar niveles altos de resistencia se requieren múltiples mutaciones.
Darunavir	V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54ML, T74P, L76V, I84V, L89V	
Fosamprenavir	L10FIRV, V32I, M46IL, I47V, I50V, I54LVM, G73S, L76V, V82AFST, I84V, L90M	
Indinavir	L10IRV, K20MR, L24I, V32I, M36I, M46IL, I54V, A71VT, G73SA, L76V, V77I, V82AFT, I84V, L90M	
Lopinavir/Ritonavir	L10FIRV, K20MR, L24I, V32I, L33F, M46IL, I47VA, I50V, F53L, I54VLAMTS, L63P, A71VT, G73S, L76V, V82AFTS, I84V, L90M	
Nelfinavir	L10FI, D30N, M36I, M46IL, A71VT, V77I, V82AFTS, I84V, N88DS, L90M	
Ritonavir	L10IRV, K20MR, V32I, L33F, M46IL, I54VL, A71VT, V77I, V82AFTS, I84V, L90M	
Saquinavir	L10IRV, L24I, G48V, I54VL, I62V, A71VT, G73S, V77I, V82AFTS, I84V, L90M	
Tipranavir	L10V, L33F, M36ILV, K43T, M46L, I47V, I54AMV, Q58E, H69KR, T74P, V82LT, N83D, I84V, I89IMV	

*Johnson IAS, *et al*. TAMs, mutaciones análogas a la timidina.
Abreviaturas: A, alanina; C, cisteína; D, aspartato; E, glutamato; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptófano; Y, tirosina.

Bibliografía

Afani A., Gallardo A.M. Resistencia a la terapia antirretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Chil Infect*, 2011;28:461-465.

Blanco J.L., Varghese V., Rhee S.Y., Gatell J.M., Shafer R.W. HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *J Infect Dis*, 2011;203:1204-1214.

Briz V., Poveda E., Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother*, 2006;57:619-627.

Dwyer D.E. Advances in HIV laboratory testing. *N S W Public Health Bul*l, 2010;21:86-88.

Escoto-Delgadillo M., Vázquez-Valls E., Ramírez-Rodríguez M., Corona-Nakamura A, Amaya-Tapia G, Quintero-Pérez N, *et al*. Drug-resistance mutations in antiretroviral-naïve patients with *established HIV-1 infection in Mexico*. *HIV Med,* 2005;6:403-409.

Friedrich B.M., Dziuba N., Li G., Endsley M.A., Murray J.L., Ferguson MR. Host factors mediating HIV-1 replication. *Virus Res*, 2011;161:101-114.

Gilliam B.L., Riedel D.J., Redfield R.R. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. *J Transl Med*, 2011;27:S9. *Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH,* 4ª ed. México, DF, 2009 [consultado 2 de marzo de 2012]. Disponible en: http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/guia_arv09.pdf.

Hoffmann C., Rockstroh J.K. *HIV 2011,* www.hivbook.com. Hamburgo: Medizin Fokus Verlag, 2011.

Johnson V.A., Calvez V., Günthard H.F., Paredes R., Pillay D., Shafer R., et al. 2011 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV* Med, 2011;18:156-164.

Knysz B., Szetela B., Gladysz A. Pathogenesis of HIV-1 infection - chosen aspects. *HIV and AIDS Review*, 2007;6:7-11.

Langford S.E., Ananworanich J., Cooper D.A., Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Res Ther*, 2007;4:11.

Lal R.B., Chakrabarti S., Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res*, 2005;121:287-314.

Luber A.D. Genetic barriers to resistance and impact on clinical response. *MedGenMed*, 2005;7:69.

Luzzi G.A, Peto T.E.A., Weiss R.A., Conlon C.P. HIV and AIDS. En: Warrell D.A., Cox T.M., Firth J.D., Benz E.J., (ed). *Oxford Textbook of Medicine*, 4ª ed. Oxford: Oxford University Press, 2003.

Manavi K. A review on infection with human immunodeficiency virus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006;20:923-940.

Menéndez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: an update. *Antiviral Res*, 2010;85:210-231.

Murphy G., Parry J.V., Assays for the detection of recent infections with human immunodeficiency virus type 1. *Euro Surveill*, 2008;13:18966.

Peeters M. The genetic variability of HIV-1 and its implications. *Transfus Clin Biol*, 2001;8:222-225.

Plantier J.C., Leoz M., Dickerson J.E., De Oliveira F., Cordonnier F., Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*, 2009;15:871-872.

Ramirez B.C., Simon-Loriere E., Galetto R., Negroni M. Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res*, 2008;134:64-73

Saag M.S., Chambers H.F., Eliopoulos G.M., Gilbert D.N., Moellering R.C. T*he Sanford guide to HIV/AIDS therapy* 2011. 19th ed. Virginia: Antimicrobial Therapy, Inc, 2011.

Sarafianos S.G., Marchand B, Das K, Himmel D.M, Parniak M.A, Hughes S.H, et al. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J Mol Biol*, 2009;385:693-713.

Sharp P.M. Origins of human virus diversity. *Cell*, 2002;108:305-312.

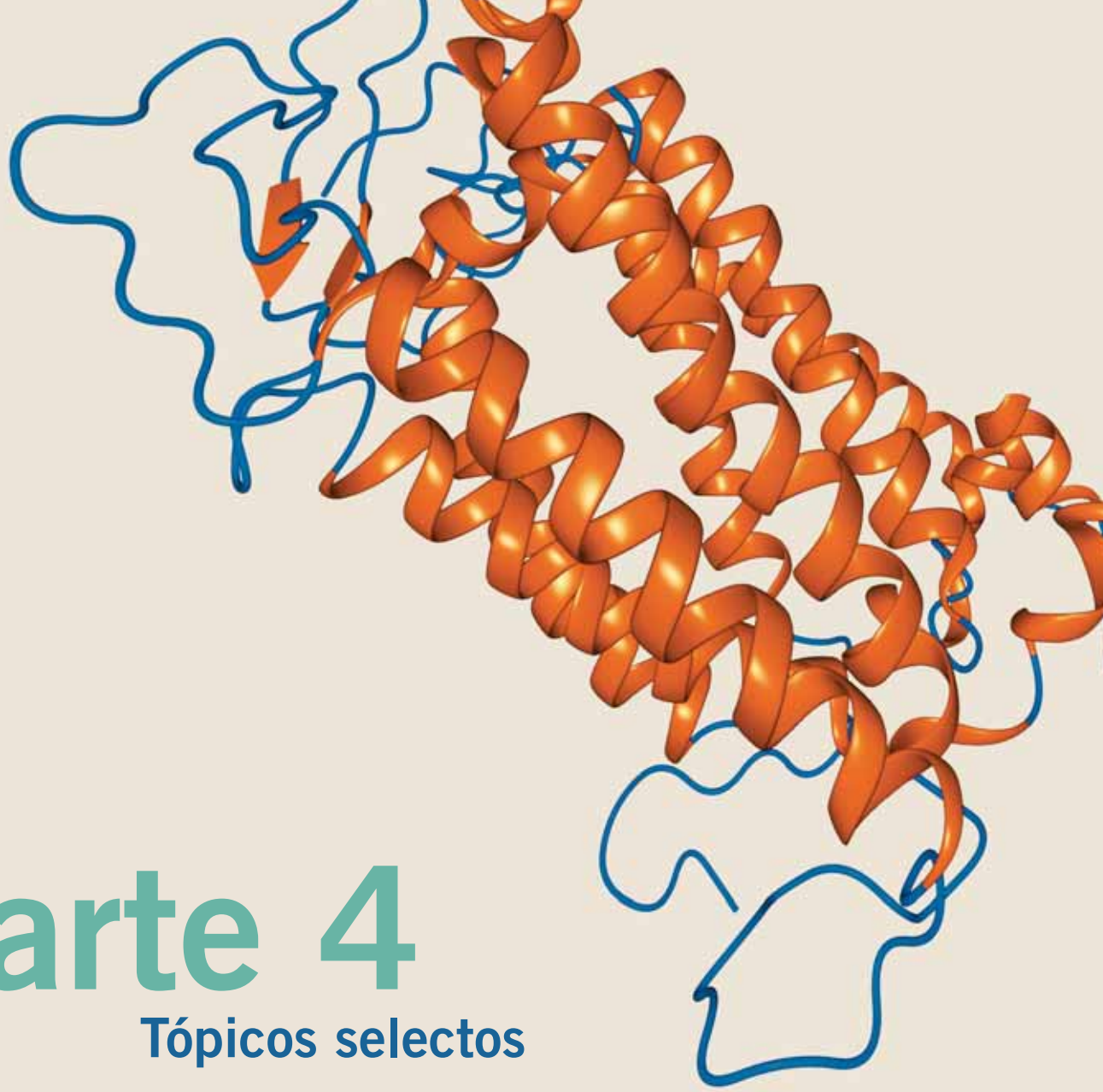
Sharp P.M., Bailes E., Chaudhuri R.R., Rodenburg C.M., Santiago MO, Hahn BH. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001;356:867-876.

Sierra Garcia de Quevedo J.J. Taxonomía y virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev Mex Patol Clin*, 2004;51:37-41.

Simon V., Ho D.D., Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*, 2006;368:489-504.

Vázquez-Valls E., Escoto-Delgadillo M., López-Márquez F.C., Castillero-Manzano M., Echegaray-Guerrero E., Bitzer-Quintero O.K., *et al*. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Mexico: emergence of BG and BF intersubtype recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2010;26:777-781.

Yusim K., Korber B., Brander C., Barouch D., De Boer R., Haynes B.F., *et al*. *HIV Molecular Immunology 2011.* New Mexico: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, 2011.

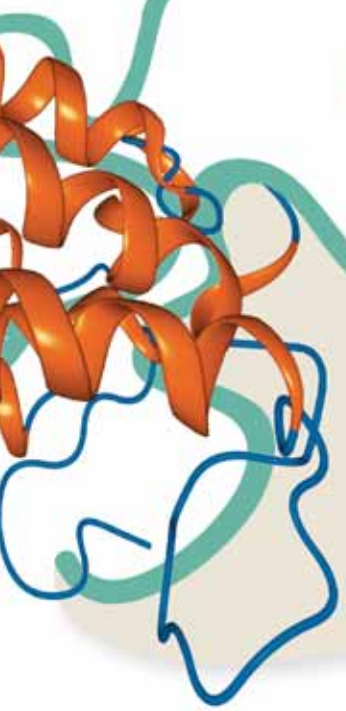


Parte 4

Tópicos selectos

Contenido

Capítulo 27 Terapia génica
Capítulo 28 Organismos transgénicos
Capítulo 29 Nutrigenómica y nutrigenética
Capítulo 30 Bases moleculares del ejercicio
Capítulo 31 Dopaje génico
Capítulo 32 Proyecto del genoma humano



Capítulo 27

Terapia génica

Ana Soledad Sandoval Rodríguez / Juan Armendáriz Borunda
Adriana María Salazar Montes / Adriana Díaz Rivera

Introducción

La terapia génica se define como la transferencia o introducción de material genético (ácido nucleico) a una célula eucariótica con el propósito de alterar el curso de una enfermedad o corregir una alteración metabólica o genética. Es una estrategia terapéutica basada en la modificación del repertorio genético de células mediante la administración de ADN o ARN destinada a curar enfermedades de origen tanto hereditario como adquirido.

A partir de 1990, los protocolos experimentales y clínicos de terapia génica registrados y aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), de Estados Unidos, aumentaron en número creciente. En 2012 los protocolos de terapia génica aprobados por el Recombinant DNA Advisory Committee (RAC), institución que regula y controla las investigaciones que involucran moléculas de ADN recombinante, son 1 786. En su mayoría, estos protocolos están dirigidos al tratamiento del cáncer (64.5%), enfermedades monogénicas (8.5%), enfermedades infecciosas (8%) y enfermedades vasculares (8.4%). De acuerdo con el vector utilizado para el envío del gen terapéutico, los vectores más utilizados son los adenovirius, con 23.3% de los protocolos, seguidos por los retrovirus (20%), ADN desnudo/plasmídico (18.5%), virus adenoasociados (4.7%) y el resto está constituido por otros vectores o estrategias como el ARN de interferencia (ARNi). De éstos, 60% se encuentran en fase I y 16.5% en fase II; el resto, en fases combinadas o fase III (datos actualizados de marzo de 2012, consultar: http://www.abedia.com/wiley/) (figura 27-1).

Las enfermedades que pueden tratarse con esta estrategia terapéutica son variadas e incluyen desde las monogénicas hereditarias hasta las poligénicas e infecciosas. Debido a ello, cada enfermedad requiere un abordaje particular, por lo que las opciones en la manipulación genética pueden dividirse en los grupos siguientes:

a) ***Adición génica***: consiste en insertar un gen funcional que exprese la proteína terapéutica en el tejido indicado. Se puede usar para corregir genes defectuosos, insertar genes con funciones nuevas a células particulares o incrementar la expresión del gen de interés.
b) ***Supresión génica:*** el objetivo es disminuir o anular la expresión de algún gen o genes a través de ARN de ARNi, oligonucleótidos antisentido o ribozimas. Esta estrategia también se aplica a la generación de animales *knockout*, mediante mutagénesis dirigida para generar un gen disfuncional, cuya función estará ausente en el organismo resultante de la clonación (véase capítulo de animales transgénicos).

Clasificación: tipos de terapia génica

Según el tipo celular

Según las células a las que se les aplique, la terapia génica puede dividirse en dos categorías:

Terapia génica en células germinales

También denominada *terapia eugénica*, va dirigida a células germinales (espermatozoides y óvulos). Al insertar genes en estas células se provoca un cambio genético permanente en el organismo que se deriva de esa célula, por lo que la modificación genética la adquieren generaciones posteriores. Este tipo de terapia no se permite en humanos, debido a las enormes implicaciones éticas que conlleva.

Terapia génica en células somáticas

En este tipo de estrategia, uno o más tejidos son sometidos a terapia génica mediante administración sistémica, tratamiento directo o previa extirpación del tejido. Además, este

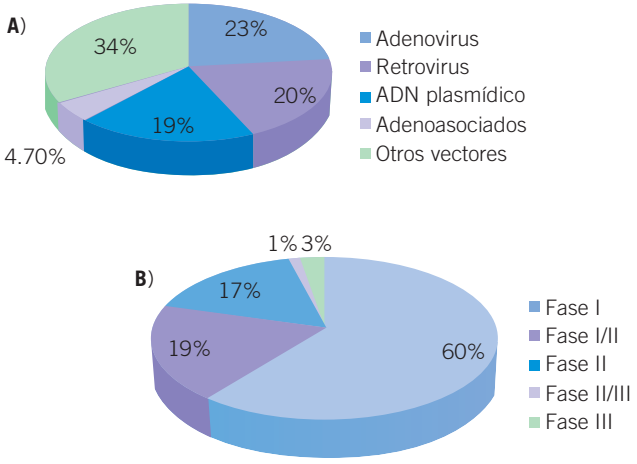


Figura 27-1. Protocolos clínicos registrados ante la FDA. **A)** Según el tipo de vector empleado, 1 076 protocolos aprobados para su aplicación en pacientes son dirigidos al tratamiento del cáncer, enfermedades monogénicas, sida y enfermedades vasculares. **B)** Porcentajes de protocolos según la fase de aplicación-comercialización en la que se encuentran.

procedimiento involucra la transfección de material genético en prácticamente cualesquiera de las células del organismo y es el que se aplica en los protocolos clínicos.

Según la metodología

Según el procedimiento utilizado para introducir el gen terapéutico, la terapia génica se divide en tres categorías, que se esquematizan en la figura 27-2.

Terapia génica *ex vivo*

Este método se basa en la obtención y el aislamiento de un tipo celular específico del paciente que se va a tratar; estas células se cultivan en el laboratorio, en donde se les introduce el gen terapéutico con ayuda de un vector. Una vez que se tiene la certeza de que las células expresan el gen terapéutico se introducen nuevamente al paciente.

Terapia génica *in vivo*

Este método consiste en la introducción directa del gen terapéutico al torrente sanguíneo del paciente, que llegará al órgano blanco, o bien se administra directamente en el órgano o tejido (músculo, piel, etc.) blanco dentro del organismo.

Terapia génica *in situ*

Se trata de una microinyección que introduce el ácido nucleico directamente a la célula, para lograr la obtención de organismos recombinantes. También se aplica en la denominada *terapia génica "suicida"*, que expresa los genes sólo en las células malignas.

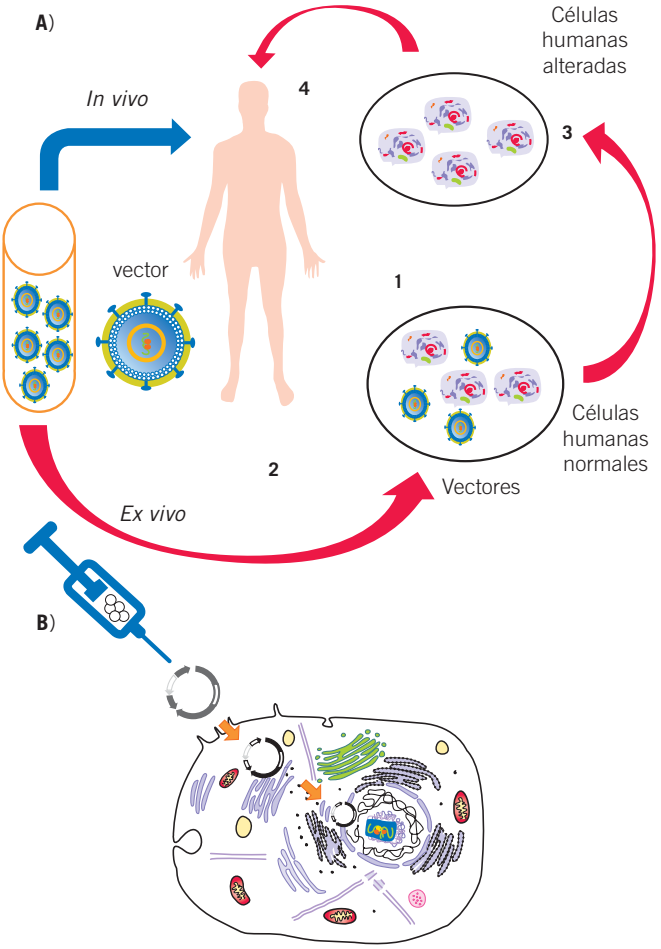


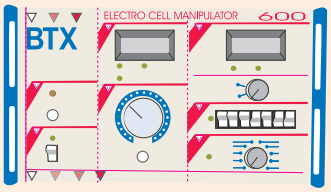
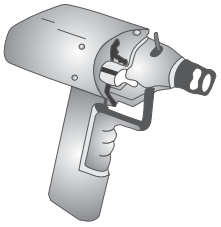
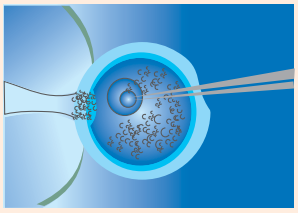
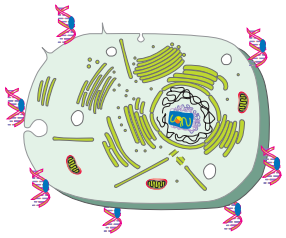
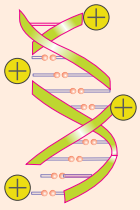
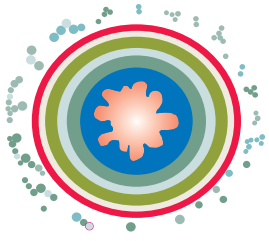
Figura 27-2. Tipos de terapia génica. **A)** Terapia génica *in vivo*. Se refiere a la aplicación directa de vectores que contengan el transgén que se desea administrar al paciente. El vector será capaz de transducir las células diana del paciente con independencia de la vía de administración, que puede ser intravenosa, intramuscular o local al tejido particular. La terapia génica aplicada *ex vivo* consiste en administrar los genes a células extraídas del paciente **(1)**, estas células se mezclan con un virus modificado, de forma que no pueda reproducirse y que transporte el gen de interés **(2)** lo que conlleva una alteración genética a las células del paciente **(3)**, las cuales se trasplantan nuevamente al paciente para producir la proteína deseada **(4)**. **B)** La terapia génica *in situ* se refiere a la administración del transgén directamente dentro de la célula. Esta estrategia implica generalmente el uso de vectores que se administran mediante microinyecciones al interior del núcleo celular.

Métodos de envío de genes

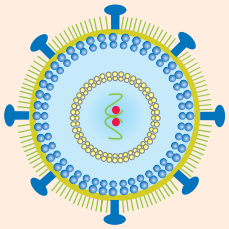
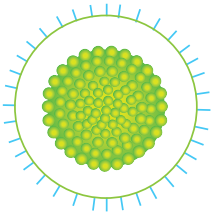
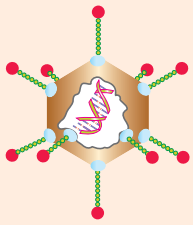
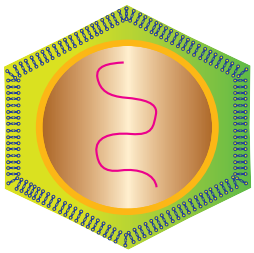
Los vehículos utilizados para la transferencia de genes a células somáticas pueden dividirse en dos categorías: vectores no virales y vectores virales.

La transferencia de genes por un vector viral se denomina *transducción* y la que se realiza por un sistema no viral se denomina *transfección*. Los métodos de envío de genes se resumen en el cuadro 27-1.

Cuadro 27-1. Características principales de los métodos de envío de genes. Este cuadro resume las propiedades de los métodos físicos, químicos o biológicos susceptibles de ser empleados en protocolos experimentales o clínicos de terapia génica en la actualidad.

		Equipo/Material	Características
Métodos físicos	Electroporación		Este método emplea un aumento de conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular causado por un campo eléctrico aplicado de manera externa. Es habitual en biología molecular como forma de introducción de diferentes sustancias en las células.
	Bombardeo de partículas		El bombardeo de partículas constituye una técnica efectiva de transferir genes tanto *in vitro* como in vivo. En este método físico el plásmido o porción de ADN es recubierto en su superficie por gotas de oro o tungsteno, de 1 a 3 micras de diámetro. Estas partículas, aceleradas por una descarga eléctrica de un aparato o por un pulso de gas, son disparadas hacia el tejido.
	Inyección directa de ADN		Otra alternativa para el bombardeo de partículas es la inyección directa del ADN o ARN puro circular y cerrado covalentemente. Una desventaja fundamental que cabe señalar es que los niveles y persistencia de la expresión de genes dura un corto periodo.
	Precipitación con fosfato		Los fosfatos forman un complejo con el ADN y éste se deposita sobre la membrana celular, el cual es endocitado.
	DEAE-dextrán		DEAE-dextrán es utilizado en células animales para transfectar ADN foráneo. El ADN se añade a la solución donde se une e/o interactúa con ADN cargado negativamente. Este procedimiento se usa para una transfección transitoria útil en varios estudios de biología molecular
Métodos químicos	Liposomas		Los liposomas catiónicos consisten en la mezcla de un lípido catiónico de carga positiva y varias moléculas de ADN con carga negativa, debido a los fosfatos de la doble hélice

(Continúa)

		Equipo/Material	Características
Métodos virales	Retrovirus		Estos virus, una vez en el interior de la célula infectada, copian su genoma, constituido por ARN, en forma de ADN bicatenario; posteriormente, este último fragmento de ADN se integra en el genoma de la célula infectada. El genoma viral permanece integrado en un cromosoma celular, mientras produce nuevos virus continuamente, transmitiéndose de generación en generación de la misma manera que cualquier otro gen celular. Sin embargo, cabe resaltar que estos vectores presentan como desventaja una inserción al azar, lo cual podría conducir a derivaciones oncogénicas.
	Herpesvirus		Estos vectores presentan un material genético compuesto por ADN bicatenario lineal. El potencial de estos virus como vectores génicos recae en la habilidad tanto de llevar grandes secuencias deADN, como para establecer infecciones latentes de larga duración. Los herpesvirus son muy diversos y varían en su tamaño de genoma, así como en la organización del mismo, lo cual conlleva a tener diferentes clases de ambos.
	Adenovirus		Los vectores adenovirales son virus no envueltos de doble cadena de ADN Son deficientes en replicación y requieren de un sistema de complementación que es la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney* 293) modificada para que produzca constitutivamente los elementos E1 virales, que son suprimidos en el vector adenoviral. Tienen la ventaja de que se logra con ellos un alto nivel de expresión, son relativamente fáciles de manejar, infectan un buen número de tipos celulares y tienen la capacidad de infectar células que no se están dividiendo.
	Adenoasociado		El virus AAV es un virus no patógeno muy común en el humano (más de 80% de la población posee anticuerpos contra el AAV). Su principal interés consiste en que es el único virus conocido de mamífero que se integra específicamente en una región concreta del genoma de la célula, en el brazo corto del cromosoma 19 humano. Actualmente, su limitación principal es que los vectores son difíciles de desarrollar en grandes cantidades y se requiere un gran número de partículas víricas para transducir las células, para lo cual hasta ahora no se han desarrollado las células de encapsidación ideales y el tamaño del gen que pueden integrar es muy limitado (menos de 4 kb).

Transferencia de genes por un vector no viral

Los métodos no virales de envío de genes basan su acción en la entrega directa de la información genética dentro de la célula blanco, y si bien estos sistemas muestran una baja toxicidad y, en general, su costo es bajo, la transferencia de genes es generalmente ineficiente y transitoria. Estos procedimientos se dividen, a su vez, en físicos y químicos.

Físicos

Electroporación: se utiliza para cultivos celulares y consiste en el uso de una celda donde se colocan las células, que se adapta a un electroportador que genera una corriente eléctrica del orden de milivoltios, con una duración de milisegundos, para generar orificios en la membrana celular. A través de estos orificios se introduce el material genético, generalmente por precipitación de complejos ADN-sales.

Bombardeo de partículas: es el método de elección para la transfección de células vegetales, ya que la pared celular es un obstáculo físico que bloquea de manera natural la transducción. También se le conoce como *pistola de genes* y consiste en el uso de un aparato de balística que dispara micropartículas de oro, rodeadas de ADN plasmídico. La fuerza aplicada permite que estas partículas atraviesen la pared celular y depositen el material genético en el citoplasma de la célula.

***Microinyección*:** la microinyección consiste en la inyección directa de ADN en el núcleo celular mediante una microjeringa y un microscopio óptico, llamado *micromanipulador*, para poder introducir el material genético a una célula blanco. Se utiliza principalmente para la producción de animales transgénicos. Tiene el inconveniente de que sólo transduce una célula al mismo tiempo y requiere material y personal especializado, pero su eficiencia es alta.

Químicos

Precipitación con fosfato de calcio: los coprecipitados de fosfato de calcio ($CaPO^{-4}$) y de ADN se utilizan para la transferencia de información genética en células tanto bacterianas como eucariotas. Éstos consisten en formar un precipitado insoluble entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. Estos precipitados forman microagregados que se depositan sobre la membrana celular y, posteriormente, son endocitados. Es la técnica más difundida para la producción de líneas celulares transfectadas de forma estable. y la de elección para experimentos *in vitro* por su bajo costo. Además, es un método rápido, simple y puede utilizarse en diversas líneas celulares.

DEAE-Dextran: esta técnica difiere de la del fosfato de calcio en que se emplea sólo para la transfección transitoria de células y se utiliza de manera eficiente sólo en algunas líneas celulares eucariotas; debido a su toxicidad en otras no resulta adecuada. Se desconoce el mecanismo por el cual el DEAE-Dextran permite la entrada de ADN a las células y su transporte hasta el núcleo, pero se asume que los complejos formados por el DEAE-Dextran y el ADN se adhieren a la superficie celular y entran por endocitosis.

Liposomas: esta técnica se basa en el uso de moléculas lipídicas de carga neta altamente positiva (catiónicas) que interactúan con el esqueleto fosfatado de la molécula de ADN. Estos polímeros de poliamidoaminas y lipopoliaminas con cargas positivas se unen electrostáticamente a las negativas del ADN y forman vesículas multilaminales que interactúan con los lípidos de la membrana celular, lo que facilita la transferencia de los ácidos nucleicos al interior de las células. También se conoce que a pH fisiológico estas moléculas contienen residuos protonables, lo que permite el control del pH del endosoma y, por tanto, la protección al ADN de la degradación por el sistema lisosomal.

Transferencia de genes por un vector viral

Los vectores virales son virus manipulados genéticamente para eliminar su capacidad autorreplicativa y en su genoma puedan incorporar genes terapéuticos. Una vez dentro de la célula pueden quedarse de manera episomal o integrarse al genoma de la célula, para posteriormente emplear la maquinaria enzimática celular y producir la proteína transgénica deseada. Los vectores virales emplean los mecanismos naturales de infección viral para introducirse en la célula —generalmente a través de receptores celulares— e introducir el gen terapéutico que contienen. Los vectores virales ofrecen grandes ventajas respecto a los no virales, y en general presentan una habilidad elevada para transducir células, por lo que son los modelos de elección para protocolos clínicos de terapia génica *in vivo*.

Los virus que se utilizan como vectores virales son retrovirus, adenovirus, adenoasociados, herpesvirus y baculovirus. Para su uso como vectores, los virus se modifican genéticamente para que sean deficientes en replicación, y en algunas ocasiones se les modifica la cápside, con la finalidad de dirigir o redirigir su célula blanco. Cada uno de estos vectores posee ventajas y limitaciones respecto a los otros, según el gen terapéutico que transporten, el tipo celular y la vía de administración. En general, un vector ideal para utilizarse en terapia génica debe cumplir las siguientes condiciones:

- Su producción debe ser fácil y eficiente.
- No debe ser tóxico o inducir reacciones inmunológicas en el paciente.
- Debe ser capaz de infectar a células tanto en reposo como en replicación.
- Debe transducir tipos celulares de manera específica.

De acuerdo con su capacidad de integrarse en el genoma de la célula huésped, los vectores pueden clasificarse como vectores integrativos o no integrativos. Los primeros se basan en retrovirus, mientras que los segundos incluyen virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), adenovirus y virus adenoasociados.

Retrovirus

Constituyen el grupo viral más desarrollado como vectores para protocolos clínicos. Los retrovirus recombinantes más usados son *Lentivirus*, derivados del virus de la leucemia murina. Éstos pertenecen a la familia *Retroviridae* y al género *Lentivirus*, y son virus dotados de envoltura con un diámetro de 80 a 130 nm. Su genoma es una cadena sencilla de ARN de aproximadamente 10 kb, lo que los obliga a realizar el proceso de retrotranscripción para su replicación. Además, tienen capacidad para incorporar transgenes de hasta 8 kb, un envío eficiente de genes a células en proliferación, y se integran en el ADN de la célula huésped, por lo que su expresión es estable. La integración se realiza de manera aleatoria en el genoma de la célula huésped, con lo que ofrecen una expresión persistente del gen terapéutico, lo que los hace útiles para su uso en enfermedades monogénicas hereditarias o crónicas. Sin embargo, presentan el riesgo, aunque extremadamente bajo, de mutagénesis insercional, debido a la posibilidad de integrarse y alterar un gen vital, modificar un gen supresor de tumores, interrumpiendo su expresión, o bien insertarse en un protooncogén induciendo su activación a oncogén. Su principal ventaja es que no contienen las proteínas virales en el vector, con lo que la respuesta inmune del huésped es nula; además, tampoco existe interferencia de una respuesta inmune previa.

Herpes virus

Son virus de doble cadena de ADN, de la familia *Herpersviridae*; el género más usado como vector es *Simplexvirus*. Su genoma mide de 120 a 240 kb, lo que le permite aceptar transgenes de gran tamaño o, inclusive, varios genes. El herpes virus puede ser una herramienta muy valiosa en células del sistema nervioso central, ya que sus células diana son las neuronas y se trata de un virus integrativo, con una

capacidad de expresión persistente. Su complejidad, así como el hecho de que aún se duda de la existencia de un herpes virus no replicativo o sin capacidad de producir las proteínas líticas, ponen en entredicho la seguridad de su utilización.

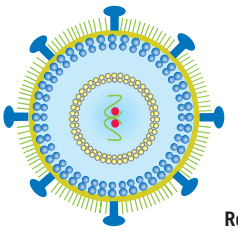
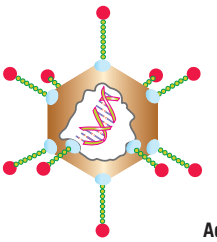
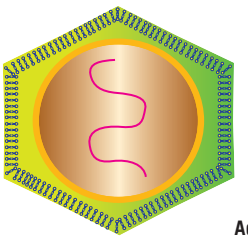
Adenovirus

Los adenovirus son miembros de la familia *Adenoviridae*. Se trata de virus de ADN de doble cadena, con una longitud de 30 a 35 kb, y pueden aceptar hasta 8 kb de material genético exógeno. El virión es de 80 a 100 nm de diámetro, sin envoltura. Se han identificado más de 50 serotipos adenovirales (Ad1-Ad50), pero sólo Ad2 y Ad5 se utilizan como adenovirus recombinantes, debido a que están perfectamente caracterizados. Pueden infectar a una gran variedad de células, tanto en división como en reposo. Dentro de la célula persisten como ADN no integrado, y su expresión es transitoria; tienen una duración media de entre 12 y 25 días, aunque algunos investigadores han reportado hasta seis meses de expresión. Los adenovirus *gutless* tienen la capacidad de acomodar material genético de hasta 20 kb, ya que carecen de prácticamente todo su genoma, con excepción de las secuencias empaquetadoras. Los adenovectores deben su éxito en terapia génica a que son biológicamente muy seguros, se producen fácilmente en el laboratorio y de manera silvestre sólo se les relaciona con infecciones respiratorias y gastrointestinales leves. Alrededor de 90% de la población humana se encuentra sensibilizada a los adenovirus, por haber estado en contacto con éstos, y por tanto, presentan anticuerpos circulantes contra ellos, lo que limita su aplicación en protocolos clínicos. Por ello, su principal desventaja estriba en la fuerte respuesta inmune que despiertan en el huésped, lo cual puede llegar a limitar la eficiencia en su uso como vehículo génico, debido a que pueden eliminarse por el sistema inmune. Por esta razón, es necesario utilizar dosis altas para lograr un porcentaje adecuado de transducción, lo que podría desencadenar una respuesta inflamatoria inespecífica grave que puede provocar daños al paciente que lo pueden conducir a la muerte.

Virus adenoasociados

Los AAV son virus relativamente pequeños, de 45 a 60 nm de diámetro, cuyo ADN es de cadena sencilla, con una longitud de 4.7 kb. Tienen una capacidad limitada para la inserción de genes, de sólo 1 kb, y son capaces de infectar tanto células en reposo como en replicación. Los AAV silvestres se integran de forma selectiva en el cromosoma 19, sitio q13.3-4; sin embargo, el virus adenoasociado recombinante pierde esta capacidad de integración y su expresión es episomal, pero estable, ya que forma estructuras de conca-

Cuadro 27-2. Ventajas y desventajas de los vectores virales más empleados. Los virus son los vectores más eficientes para el envío de genes, sobre todo a células de mamífero. Este cuadro resume las características que hacen a los vectores virales ideales para ciertas aplicaciones, a pesar de sus limitaciones.

Virus	 Retrovirus	 Adenovirus	 Adenoasociado
Ventajas	• Transducción eficaz. • Integración genómica y expresión persistente. • Permite la expresión a largo plazo del gen terapéutico. • Penetra efectivamente en las células de división. • Se integra en material genético de la célula huésped sin introducir los genes virales.	• Se logra un alto nivel de expresión. • Relativamente fáciles de manejar. • Infectan un buen número de tipos celulares (incluyendo células que no se están dividiendo). • Leve efecto como agentes patógenos en el ser humano (p. ej., resfriados).	• Generan baja respuesta inmune.
Desventajas	• Dependencia de la división celular. • Dificultad para controlar y asegurar la expresión. • El tamaño de los genes que se introducirán es limitado. • Existe potencial de daño al genoma, por integrarse en éste al azar.	• Expresan varias proteínas virales que resultan inmunogenéticas. • La introducción repetida no es satisfactoria normalmente, a menos que la exposición inicial esté acompañada de una modulación inmunológica para suprimir la respuesta inicial a las proteínas de la cápsula adenoviral.	• Requieren de los genes virales para integrarse. • Sólo translucirán células en presencia de un adenovirus. • El tamaño del gen que pueden integrar es muy limitado (menos de 4 kb). • Necesitan un gran número de partículas víricas para transducir las células. • La preparación de partículas víricas de vectores AAV es difícil.

támeros cabeza-cola que persisten, en promedio, desde seis meses hasta más de un año. Su uso es muy prometedor, debido a que no generan respuesta inmune humoral en el huésped y se ha reportado la expresión del gen terapéutico por más de un año; sin embargo, tienen el inconveniente de que son difíciles de producir y los títulos que se obtienen son bajos.

En el cuadro 27-2 se resumen las ventajas y desventajas de los diferentes virus usados como vectores en terapia génica. Como conclusión, el vector idóneo será el que sea capaz de entregar el gen a la célula blanco y logre expresarlo de manera eficiente.

Características deseables de un vector

Con independencia del tipo de vector que se utilice en la terapia génica, el vector ideal es aquel que presente las siguientes características:

Facilidad para producirse a títulos elevados

El empleo de vectores, en protocolos ya sea experimentales o clínicos, requiere cantidades elevadas de éstos, especialmente si la administración es sistémica, por lo que aquellos vectores que pueden producirse con facilidad en títulos elevados, mayores de 10^8 partículas/ml, son los ideales.

Metodología de producción rápida y reproducible

La metodología para la generación y producción de los vectores debe ser reproducible en cualquier laboratorio y no involucrar métodos complicados que puedan entorpecer el proceso.

Introducción del transgén precisa y estable

Una transferencia eficaz en las células blanco y una alta especificidad son las características ideales con las que debe contar el vector, sobre todo cuando la administración es sistémica y va dirigida a que se exprese en un tipo particular de tejido o célula.

Respuesta inmune nula o mínima en el huésped

El vector debe ser lo menos inmunológico posible para el huésped, lo que permitirá que la expresión del transgén sea más prolongada, además de evitar reacciones inmunológicas adversas.

Transgén más elementos regulatorios

Secuencias de genes estables con secuencias regulatorias, que permitan una expresión estable y de la información genética introducida.

ARN de interferencia

El ARNi es un mecanismo que involucra el empleo de secuencias específicas de ARN de doble cadena (ARNds) para un gen específico, con la finalidad de bloquear su expresión. Esta técnica comenzó en la década de 1980, cuando se observó que algunas moléculas de ARN pequeño podían anular la expresión de varios genes en células de plantas y animales, al unirse por complementariedad de bases a las cadenas de ARN mensajero (ARNm) e inhibir el proceso de síntesis de proteínas. El descubrimiento no tuvo mayor relevancia hasta que, en 1988, al inyectar dos tipos de ARN pequeño (ARN sentido –el resultante de la transcripción– y ARN antisentido –el complementario al ARN sentido–) en células de gusanos, los ARN se unieron, generando ARNds. Para sorpresa de los investigadores, este ARNds produjo una inhibición mayor de los genes en estudio que la conseguida hasta ese momento con otros sistemas, como la adición de una sola cadena de ARN pequeño. A este sistema de inhibición se le conoce como ARN interferente o ARNi. De manera natural, las células producen ARNds de gran longitud, que son cortados por la enzima Dicer a fragmentos de ARNds de 21nt, que tienen extremos 5' y 3' fosfatados y un extremo saliente de 2 a 3 nucleótidos. La enzima Dicer contiene un dominio helicasa de ARN y es dependiente de adenosín trifosfato (ATP). En la figura 27-3 se esquematiza este proceso de producción y procesamiento de un ARNi dentro de una célula eucariota. En poco tiempo, el ARNi se ha convertido en una herramienta clave para el estudio de la función de un gen *in vitro* e *in vivo*, ya que el bloqueo de la expresión de un gen en particular a través de ARNi indica cuál es su función dentro de una célula. Los ARNi pueden enviarse a la célula blanco a través de un vector para dar seguimiento al efecto que tiene el bloqueo de un gen en el funcionamiento celular.

Aplicaciones del ARNi

Se considera que el uso de los ARNi es uno de los mayores aportes de la década a la genómica, por lo que la terapia génica basada en ARNi tiene un gran potencial, especialmente contra enfermedades infecciosas. En muchos protocolos clínicos de VIH se está empleando el envío de ARNi que bloquea la expresión de los genes *pol* del VIH, como la transcriptasa inversa, la proteasa y la integrasa, con resultados muy prometedores para los pacientes.

Aplicaciones clínicas de la terapia génica

El conocimiento de las bases genéticas de algunas enfermedades y la reciente secuenciación del genoma humano han abierto la posibilidad de esta estrategia terapéutica. Esto supone perspectivas para la curación de muchas enfermedades a las que se pretende combatir mediante los genes, como elementos curativos. Por ello, en este momento la terapia génica se ve como una nueva forma de medicina molecular aplicable a la mayoría de las enfermedades, no sólo las monogénicas sino también las multifactoriales, en cuyo tratamiento puede ser útil la modificación de la expresión génica.

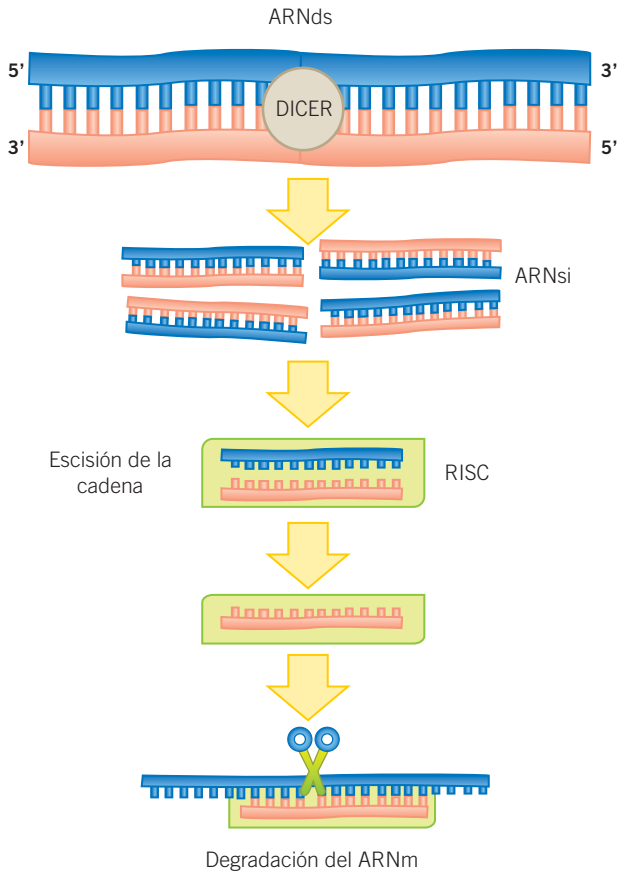


Figura 27-3. Mecanismo del ARN de interferencia. La enzima Dicer corta ARNds y genera las secuencias ARNsi; éstas se incorporan al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), el cual se dirige contra el ARNm complementario del ARNsi. Una vez lograda la hibridación entre el ARNsi y el ARNm se induce su degradación.

Terapia génica contra el cáncer

El cáncer es la enfermedad en la que se encuentran registrados la mayor cantidad de protocolos clínicos con terapia génica, entre los que se encuentran la estimulación del sistema inmune para combatir las células cancerígenas, la terapia suicida para inducir la muerte de las células tumorales, la suplementación de genes supresores de tumores y el bloqueo de oncogenes.

Entre los diferentes protocolos clínicos, el empleo de oligonucleótidos antisentido o estrategias de silenciamiento contra una variedad de oncogenes, como *k-ras*, *c-myc*, *bcr-abl* y *bcl-2*, han dado buenos resultados cuando estas maniobras se han combinado con quimioterapia.

Por otro lado, ya que en general la respuesta inmune de los pacientes con cáncer está disminuida, ésta se ha tratado de potenciar mediante terapia génica *ex vivo* en células tumorales o células inmunes efectoras (como linfocitos T o presentadoras de antígenos, como dendríticas y macrófagos). En este sentido, se han validado, a nivel preclínico, reportes en que se han empleado células dendríticas modificadas genéticamente para producir epítopes capaces de inducir respuesta inmune específica. En protocolos clínicos de vacunación con ADNc, se han empleado citocinas, como interleucina (IL) 2, IL-4, IL-7, factor de necrosis tumoral, interferón gamma y GM-CSF. En las células de tumor, mediante terapia génica con estos transgenes, se ha logrado la expresión de las moléculas coestimuladoras, como CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2), presentes en las células presentadoras de antígenos, pero que no se expresan en las células tumorales —lo que impide una correcta activación y maduración de las células T contra los epítopes de las células tumorales.

Por otro lado, la terapia suicida es una estrategia de terapia génica que suele aplicarse en tumores sólidos. Se basa en el empleo de genes de enzimas capaces de activar profármacos que presentan una leve toxicidad para las células que expresan el transgén y que, por tanto, pueden metabolizar el fármaco. Estas enzimas son virales, como la cinasa del herpes simple (HSVTK) o bien bacterias o levaduras, como la citocina desaminasa (CD). La enzima más empleada es HSVTK, que fosforila al ganciclovir y lo convierte en un metabolito tóxico. La CD convierte a la molécula farmacológica 5-fluorocitosina (5-FC) en su forma toxica el metabolito 5-fluorouracilo. Ambos transgenes se han empleado en numerosos protocolos preclínicos y clínicos para tumores cerebrales, de cabeza y cuello, y ováricos. Cuando se emplean adenovirus como vectores suelen administrarse directamente en el tumor, seguidos de la administración de GCV. Para evitar su posible efecto tóxico se realizan constructos con promotores específicos del tumor para asegurar la transducción exclusiva de las células blanco tumorales.

Terapia génica contra agentes infecciosos

Se enfoca en la transducción de genes que bloqueen o disminuyan la expresión de genes involucrados en la replicación del agente infeccioso, o bien que limiten o impidan su diseminación en el organismo infectado. Las estrategias se basan en la inhibición de proteínas indispensables para la replicación del microorganismo mediante estrategias antisentido, señuelos de ARN y ARN catalíticos (ribozimas), o bien en la estimulación específica del sistema inmune contra el agente infeccioso utilizando vacunas genéticas o linfocitos específicos del patógeno.

Ejemplos específicos de estas aplicaciones incluyen el uso de ribozimas multidiana para regiones conservadas del genoma del VIH-1, las cuales han demostrado una inhibición eficiente de la replicación viral. Para el caso del virus de la hepatitis Cse han empleado ARNsi, que tienen como secuencia blanco el *loop* II de la región 5' no traducida, ya que han demostrado la inhibición efectiva de la expresión de seis genotipos del virus.

Terapia génica contra enfermedades monogénicas

En septiembre de 1990, los National Institutes of Health aprobaron por primera vez un protocolo de terapia génica en humanos, fecha que coincidió con el inicio del Proyecto Genoma Humano. Los doctores William French-Anderson, Michael Blaese y Steven Rosenberg introdujeron el gen que codifica para la enzima adenosín desaminasa (ADA). Los niños que padecen inmunodeficiencia severa combinada (SCID) por deficiencia de la enzima ADA no tienen respuesta inmune adecuada, ya que la ADA participa en el metabolismo de las purinas y su deficiencia ocasiona la acumulación de dATP, metabolito que inhibe la acción de la reductasa ribonucleótido-difosfato, que modifica los ribonucleótidos a desoxinucleótidos. La proliferación de linfocitos depende de la síntesis de dNTP, por lo que sin una reductasa de ribonucleótidos funcional, la proliferación de linfocitos se inhibe y el sistema inmune se compromete. A los pacientes con esta afección se les conoce como *niños burbuja*, ya que son muy vulnerables a sufrir infecciones, por lo que era necesario mantenerlos en un medio ambiente estéril como medida paliativa. La estrategia de terapia génica dirigida a estos pacientes consistió en aislar linfocitos T de los niños afectados e introducir el gen *ADA* normal usando un vector retroviral. Una vez insertado el gen, las células se devuelven a los pacientes. El tratamiento duró un año con administraciones cada uno o dos meses, y los niños mostraron mejoras clínicas significativas, y fueron capaces de iniciar una respuesta inmunitaria, lo que produjo una importante disminución en el número de infecciones. El riesgo de una posible mutagénesis insercional, después de repetidas transferencias retrovirales, se vio confirmado al presentarse leucemia en dos de 12 de los niños tratados. En febrero de 1991 se autorizó también el mismo protocolo en Italia, al doctor Bordignon, en el Hospital San Raffaele de Milán. En 1995 ambos grupos de investigación publicaron los resultados y pusieron de manifiesto la eficacia de la terapia génica con retrovirus en estos pacientes (figura 27-4).

Terapia génica contra la cirrosis hepática

La etiologías de la cirrosis hepática incluye las hepatitis virales, el consumo crónico de alcohol, la esteatohepatitis, etc. El daño hepático crónico conlleva a los hepatocitos a apoptosis y también existe una transformación fenotípica de las células estelares hepáticas (CEH) a un tipo miofibroblástico, proliferativo y sintetizador de proteínas de matriz extracelular (MEC). Esto ocasiona que el parénquima se sustituya por proteínas de MEC, como colágena tipos I y IV. La acumulación de las proteínas de MEC es el resultado de un aumento en su síntesis, así como de una disminución en su degradación, debido a una reducción de la cantidad de metaloproteinasas (MMP), enzimas degradadoras de proteínas de MEC o de su actividad enzimática ocasionada por una sobreexpresión de sus inhibidores específicos los TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteases*). Las CEH también comienzan a secretar moléculas, como el factor de creci-

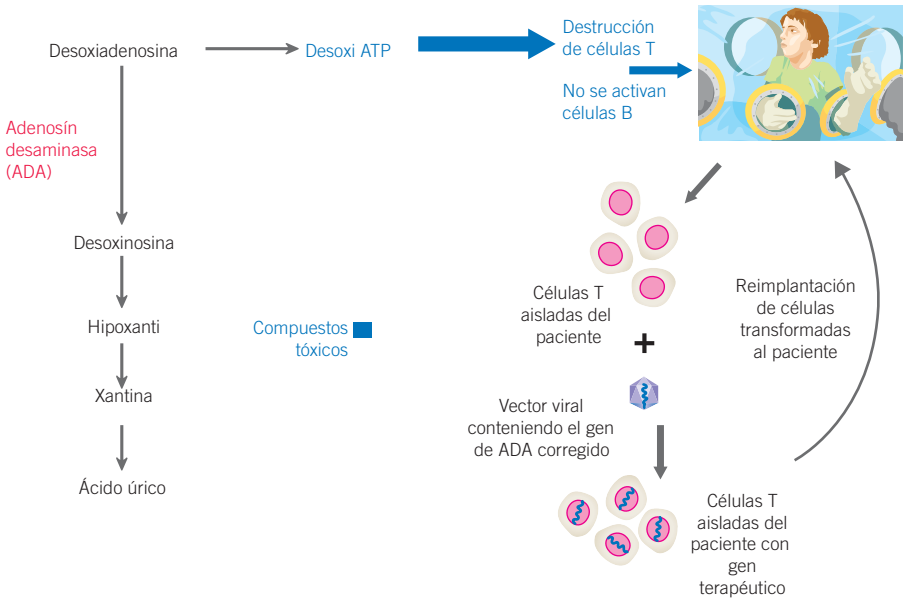


Figura 27-4. Terapia génica para la deficiencia de la enzima adenosin diaminasa (ADA). Este protocolo fue el primer éxito de la terapia génica en la clínica y se realizó en 1990. La inmunodeficiencia severa combinada está ocasionada por la falta de la enzima ADA, que es indispensable para el metabolismo de las purinas, y sin la cual no se realiza la proliferación de las células T del sistema inmune.

miento de transformación β1 (TGF-β1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El TGF-β es la citocina profibrogénica por excelencia y, a través de su señalización, aumenta la síntesis de colágenas fibrilares (especialmente, colágena tipos I, III y IV) y la producción del TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo 1). Como consecuencia de estos eventos, se produce la fibrosis hepática y a lo largo de los años se puede desarrollar cirrosis. Las estrategias de terapia génica para el abordaje de la cirrosis incluyen la inhibición de la expresión del TGF-β, el aumento de la expresión de MMP o de moléculas fibrolíticas para aumentar la degradación de la cicatriz fibrótica. En este sentido, se han desarrollado vectores adenovirales con los genes de MMP8, uPA y un receptor truncado para TGF-β para el tratamiento de la cirrosis hepática. Estos vectores ofrecen la ventaja de que presentan un tropismo natural por el hígado cuando se administran por vía sistémica, lo que constituye una ventaja cuando se emplean para el tratamiento de la cirrosis hepática.

La MMP8 es una metaloproteinasa cuyo sustrato principal es la colágena tipo I, que se incrementa considerablemente en la fibrosis. Esta enzima es producida por los neutrófilos, por lo que su sobreexpresión en células hepáticas es una estrategia innovadora. Los resultados con este transgén demostraron reducciones de 45% del área fibrótica, un aumento en la expresión de genes fibrolíticos, como MMP3 y TIMP1 libre, mejorías en marcadores hepáticos de funcionalidad y regeneración celular (HGF), y reducciones en el gen de TGF-β1. Por otro lado, el transgén *uPA* (activador de plasminógeno tipo urocinasa) induce la activación de varias MMP y, como consecuencia, provoca efectos antifibróticos, que se reflejan en reducciones de 85% del área fibrótica a los 10 días posadministración y un aumento significativo en la expresión de marcadores de regeneración hepática celular, como HGF y su receptor c-Met, y en el número de células positivas a PCNA, así como mejorías en los niveles de marcadores hepáticos de funcionalidad. La tercera estrategia es el uso de un receptor truncado de TGF-β que oblitera la señalización de esta citocina profibrogénica, e induce de esta manera que muchos genes fibrogénicos se reduzcan (*Col I, TGF-β1, PDGF, PAI-1* y *TIMP1*) y varios genes implicados en la degradación de MEC se incrementen, como *MMP3*.

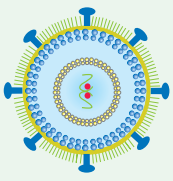
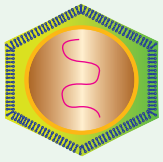
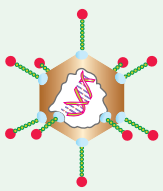
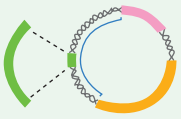
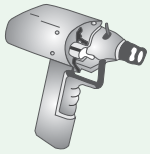
Perspectivas de la terapia génica

En la actualidad, en la literatura médica internacional se han descrito 763 protocolos para realizar terapia génica en humanos, que involucran a más de 7 000 pacientes en todo el mundo. El 70% de las terapias realizadas se han llevado a cabo para intervenir procesos neoplásicos, 12% para enfermedades infecciosas, y 9% para enfermedades monogénicas. Hace 20 años la terapia génica se veía como una ficción; hoy día representa una opción real que puede revolucionar el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas, monogénicas e infecciosas que se consideraban mortales.

Ejercicios de integración

Instrucciones:
Llene el cuadro siguiente con la información correspondiente para cada método de envío de genes o vector viral:

Cuadro 27-3

					
Nombre					
Clasificación					
Ventajas					
Capacidad transgén					
Aplicación					

Bibliografía

Capecchi M.R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 1980;22:249-260.

Chen C.A., Okayama H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques*, 1988;6:632-638.

George J.S. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Therapy*, 2003;10:1135-1141.

Chu .G, Hayakawa .H., Berg P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res*, 1987;15:1311-1313.

Felgner P.L., Gadek T.R, Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., *et al,* Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987;84:7413-7417.

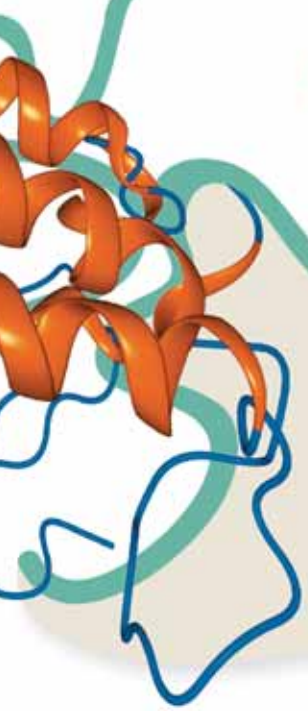
Felgner P.L., Ringold G.M. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, 1989;337:387-388.

Russell D.W., Hendrie P.C. Gene targeting with viral vectors. *Mol Ther*, 2005;12:9-17.

Kenz M., Wolf E.D,. Wu R., Sanford J.C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 1987;327:70-73.

Verma I.M., Kootstra N.A., Gene therapy with viral vectors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2003;43:413-439.

Verma I.M., Pfeifer A., Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev genomics Hum Genet, 2001*;177-211.



Capítulo 28

Animales transgénicos y clonación

Jesús Javier García Bañuelos / Blanca Estela Bastidas Ramírez
Juan Armendáriz Borunda

Introducción

El rápido avance de la investigación biotecnológica ha favorecido el desarrollo de metodologías que permiten introducir, eliminar o modificar de forma específica un gen o determinados tipos de genes en el genoma de un organismo, para producir seres con características nuevas y mejores, o bien para que pierdan alguna función específica. Este tipo de métodos pueden incluirse dentro de la llamada *ingeniería genética*, y a los organismos obtenidos se les denomina *organismos modificados genéticamente* u *organismos transgénicos*. Los animales transgénicos se definen como aquellos que han sido manipulados genéticamente, insertando un gen que no forma parte natural de su genoma (transgén), con la finalidad de que se incorpore de manera estable, para que pueda heredarse. Así, los animales transgénicos tienen la capacidad de producir proteínas que no están codificadas de manera natural en su genoma o bien se les inserta un gen con un promotor que permite expresar la proteína cuando no se lleva a cabo de manera natural. Un ejemplo de ello es la generación de un salmón que sobreexpresa la hormona del crecimiento; de manera natural, el salmón deja de expresar la hormona del crecimiento en temperaturas frías y el transgénico nunca deja de hacerlo, de tal manera que en el mismo tiempo de desarrollo el salmón transgénico llega a crecer el doble o más que el silvestre (figura 28-1).

Por otro lado, la estrategia más efectiva para conocer la función de una proteína es eliminar su función biológica del organismo y analizar el efecto generado. Con este fin se crearon los animales transgénicos denominados *knockout*, en los cuales se altera el gen de una proteína particular con la finalidad de que no se exprese o que, al expresarse, se produzca una molécula no funcional. Uno de los ratones *knockout* más conocidos presenta una modificación en el gen de la leptina (gen *ob*). Este ratón, al no expresar la proteína funcional, se convierte en un ratón obeso, ya que la leptina participa en la vía de inhibición del apetito (figura 28-2).

Las proteínas son fundamentales para que un organismo funcione de forma apropiada; es decir, un cambio en la estructura, función o cantidad de alguna de ellas se ve reflejado en el funcionamiento general del organismo. La modificación de una sola proteína puede inducir el mal funcionamiento de un órgano, tejido o célula, y por ende influir en el deterioro o muerte del organismo. La información necesaria para producir y regular la expresión proteica en todos los tejidos está en los genes, y éstos contienen la información específica para generar una proteína, y determinan la estructura y función que debe tener, así como la cantidad y en cuáles células se deben producir. Por ello, la información genética del individuo desempeña un papel importante en el desarrollo de una enfermedad, lo que ha generado en la clínica la necesidad de utilizar de manera constante técnicas de biología molecular para la predicción del desarrollo de una enfermedad, la confirmación de diagnósticos o la elección de un tratamiento.

Así, la utilización de modelos experimentales de enfermedades ha sido una de las herramientas que más información ha proporcionado a la medicina. En la actualidad, el desarrollo de animales transgénicos y *knockout* en investigación biomédica ha aportado grandes conocimientos para entender la interacción de genes y moléculas del medio ambiente que promueven la aparición de enfermedades.

Creación de un transgén

El ADN de un organismo contiene toda la información genética; es decir, es donde se encuentra la información para que se produzcan todos los ARN y las proteínas del organismo. Esta información está codificada en secuencias de nucleótidos llamadas *genes*, que están formados por dos

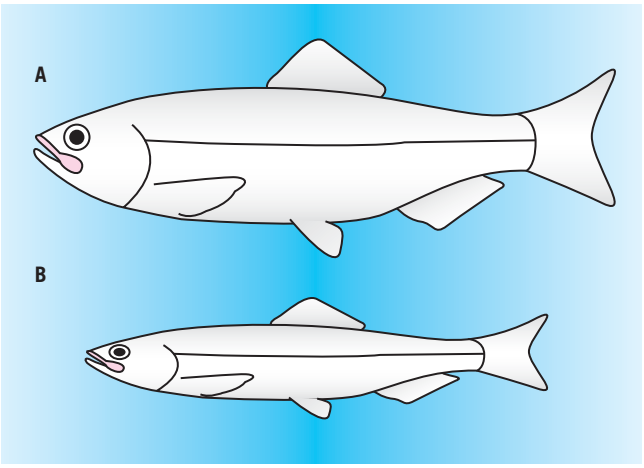


Figura 28-1. Animales transgénicos. Los animales transgénicos son animales a los cuales se les añade un gen que codifica para una proteína que ejercerá una función inexistente en el animal silvestre. **A)** Salmón transgénico, al cual se le añadió el gen modificado de la hormona del crecimiento, que se expresará permanentemente, por lo que el salmón transgénico llega a medir más del doble de un animal silvestre. **B)** Salmón silvestre que deja de expresar la hormona del crecimiento en agua con temperaturas bajas; se observa una diferencia marcada en el tamaño con respecto al transgénico.

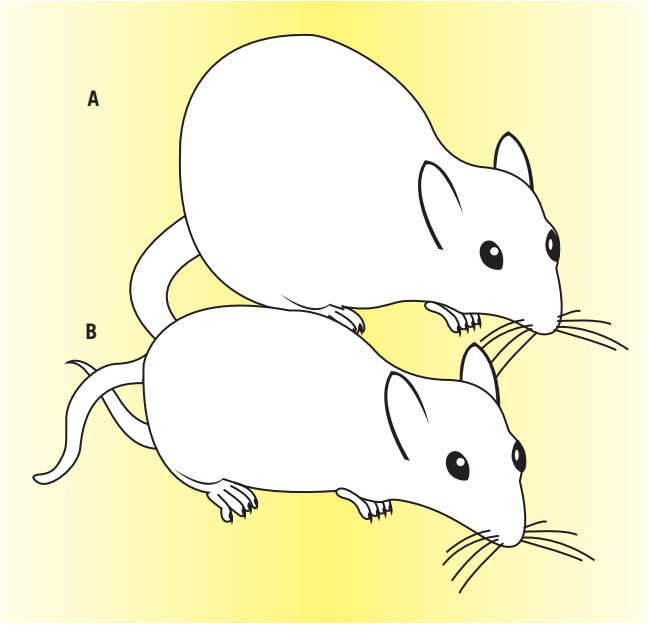


Figura 28-2. Animales *knockout*. Los animales *knockout* son aquellos a los que se les elimina un gen en su genoma, que se refleja con la pérdida de una función. **A)** Ratón *knockout* para el gen de la leptina: al quitarles la expresión de esta proteína, los ratones no pueden regular la ingesta de alimentos y se convierten en animales obesos. **B)** Ratón normal, al que la expresión de la leptina le permite regular la ingesta de alimentos.

regiones: región promotor y región codificante. La estructura del ADN es en esencia la misma en todos los organismos; pese a ello, puede haber grandes diferencias en el control de la expresión de los genes (p. ej., cuando se introduce un gen que proviene de una bacteria en una célula animal, sin que se le realice ninguna modificación, pocas veces funcionará de forma correcta). Por tanto, el término *transgén* se refiere a un gen que es insertado en un genoma o vector genético; generalmente, son genes manipulados por ingeniería genética, diseñados con las regiones promotoras y codificantes que son funcionales en la célula u organismo en donde va a introducirse. Estos diseños pueden incluir combinaciones de ADN de diferentes especies, como por ejemplo un promotor viral y una región codificante proveniente de un humano; este transgén puede funcionar perfectamente en cualquier célula eucariota. Sin embargo, si se quiere producir una proteína eucariota en una célula procariota, debe diseñarse un transgén que contenga un promotor procariote y, además, debe modificarse la región codificante del gen eucariote para que el ARNm eucariote pueda traducirse en la célula procariota, ya que la secuencia de reconocimiento del codón de inicio es diferente en eucariotas (Kozak) que en procariotas (Shine-Dalgarno). A los transgenes también se les ha llamado *genes exógenos* o *foráneos*.

En este sentido, para crear un transgén, en primer lugar debe tomarse en cuenta en qué organismo se insertará; es decir, hay que conocer con precisión qué secuencia promotora controlará su expresión, cuál es la secuencia específica que codificará para la proteína deseada y qué secuencia de poliadenilación contendrá, para que los procesos de la transcripción y traducción se lleven a cabo de forma correcta.

Muchos genes tienen su expresión únicamente en tejidos particulares y son controlados por una secuencia promotora tejido-específica, la cual no funciona en otro tejido. En el proceso de generación del transgén, generalmente la secuencia promotora del donante se sustituye por otra especialmente diseñada para asegurar que el gen funcionará en los tejidos adecuados del organismo receptor. Este procedimiento es crucial cuando, por ejemplo, el gen tiene que expresarse en glándulas mamarias para secretar la proteína en la leche de un mamífero o solamente en un órgano en particular. Además de la secuencia promotora, el transgén debe contar con una secuencia de poliadenilación, la cual le confiere el tiempo de vida media al ARNm transcrito, es decir, entre mayor es la cola de poli-A, mayor es el tiempo de vida media del ARNm (figura 28-3).

Ratones transgénicos

El ratón es el animal más utilizado en modelos experimentales de enfermedades, debido a su tamaño, fácil manejo, ciclo reproductivo corto y gran tamaño de camada. Después del hombre, el ratón es el mamífero más estudiado a nivel genético, por lo que se conocen miles de mutaciones y

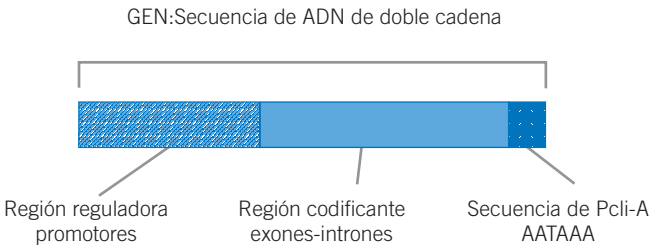


Figura 28-3. Estructura del gen. El gen está constituido de ADN de doble cadena y contiene tres regiones: **a)** región reguladora, donde se encuentran los promotores, los potenciadores y los inhibidores; **b)** región codificante, conformada por exones e intrones, y **c)** cola de Poli-A, la cual determina la vida media del ARNm.

se cuenta con una gran cantidad de genotecas, sondas y anticuerpos. A la par de la secuenciación del genoma humano, se ha secuenciado el genoma del ratón, y muchos de los genes del ratón tienen su contraparte en los humanos; sin embargo, existen diferencias importantes en la estructura de los genes y la actividad de las proteínas que codifican. Si estas variaciones se ponen en el contexto de las enfermedades hereditarias o adquiridas, donde el cambio de un solo nucleótido en un gen o la asociación de varios cambios en diferentes genes pueden causar enfermedades, generar un ratón transgénico o *knockout* es una herramienta importante para obtener fenotipos similares a los de las enfermedades humanas. Como ejemplo cabe citar la obesidad, en cuyo caso se identificó el gen de la leptina, gen *ob* (*obese*), así como el del receptor de leptina, gen *db*; al eliminar estos genes en el ratón se produce el fenotipo de obesidad. Por tanto, parte de las investigaciones biomédicas está dirigida a aumentar la disponibilidad de modelos animales de fácil manejo en el laboratorio, como es el caso del ratón, mediante la generación de animales *knockout* o transgénicos que sobreexpresan alguna proteína. Por ello, se han conformado iniciativas similares a las que secuenciaron el genoma humano, con la finalidad de establecer grandes bibliotecas de células embrionarias de ratón, que contienen mutaciones nulas para cada gen predicho en su genoma. Estas iniciativas son el International Knockout Mouse Consortium (IKMC) y el Knockout Mouse Project (KOMP), de los National Institutes of Health. La denominada era *posgenómica* está avanzando rápidamente y es esencial el estudio funcional de las secuencias obtenidas de los proyectos de secuenciación del genoma humano y murino (cuadro 28-1).

El primer paso para conocer al ser humano a escala molecular fue el Proyecto del Genoma Humano. Aunque el proyecto está culminado y se conocen alrededor de 21 000 genes secuenciados que codifican para proteínas, la siguiente tarea de los investigadores es el conocimiento de sus funciones. Por ello, la generación de los ratones transgénicos en el estudio de enfermedades humanas es de suma importancia para reconocer los genes implicados en ellas.

Cuadro 28-1. Comparación del genoma humano y del ratón.

Organismo	Genoma en Mb	Número de genes
Humano	3200	Aprox. 23 000
Ratón	2500	Aprox. 30 000

Generación de ratones transgénicos

La metodología más utilizada para generar un ratón transgénico se denomina **microinyección pronuclear de transgenes en pronúcleos de óvulos fertilizados (cigotos).** Para realizar esta técnica, se induce una superovulación en una hembra. Posteriormente, se aparea con el macho, y 24 horas después de la fecundación se obtienen los ovocitos. De manera individual, en cada pronúcleo se inyecta, por medio de una microaguja, entre 20 y 200 copias del vector que contiene la secuencia del transgén, directamente en el pronúcleo, que generalmente es el masculino, por ser el de mayor tamaño. Este procedimiento debe realizarse antes de la fusión de los pronúcleos masculino y femenino que generarán el blastocisto (figura 28-4).

El vector administrado contiene la secuencia completa del gen, incluidas las regiones reguladoras, además de secuencias de recombinación homóloga inespecífica que se integran en regiones no codificantes del genoma. Se implantan alrededor de 10 a 20 ovocitos microinyectados dentro del oviducto de una madre seudopreñada (hembra apareada con un macho estéril). Las crías nacen después de 19 a 21 días, completando el ciclo normal de gestación del ratón. Entre 10 y 40% de las crías tendrán el transgén integrado en su genoma (figura 28-5). Para saber si se integró el transgén, se realiza un análisis del ADN de las crías y éste se obtiene mediante una biopsia de la cola del animal. Cada una de las crías se genera de un ovocito microinyectado en un pronúcleo. Por consiguiente, a estas crías se les denomina *funda-*

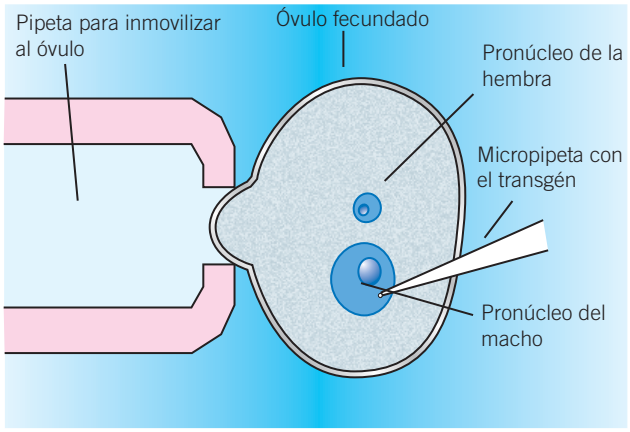


Figura 28-4. Microinyección pronuclear de transgenes. El transgén es inyectado utilizando una micropipeta, en el pronúcleo del macho de un óvulo fecundado, para su integración en el genoma, poco antes de la fusión de ambos pronúcleos.

dores, ya que son heterocigotos, puesto que sólo se les modificó un pronúcleo y únicamente presentan la modificación en un alelo. Es importante señalar que la integración del transgén es aleatoria, por lo que el lugar y el número de copias de integración no se pueden controlar. Ambos parámetros influyen en el grado de expresión de la proteína y sus efectos en el ratón, y cada cría es diferente de la otra. En estos ratones la inserción del transgén no debe alterar la expresión de los genes endógenos del ratón. Para generar ratones homocigotos es necesario aparear a dos *ratones fundadores* y que, siguiendo las leyes mendelianas, se les transmita a alguna de las crías el alelo que contiene el transgén por parte de los padres.

Generación de ratones *knockout*

El proceso de manipulación genética para generar este tipo de ratones consiste en dos pasos:

1. En primer lugar, debe construirse el vector que contiene el gen alterado o no funcional de interés, compuesto por una región que contiene el gen de interés modificado y dos regiones de homología en cada extremo del gen, indispensables para la recombinación homóloga (las mismas que se encuentran en el genoma que se va a modificar).
2. Una vez hecho esto, el vector se introduce en células madre embrionarias, punto clave para el desarrollo de esta metodología. Posteriormente, estas células son inyectadas en los embriones de ratón que son implantados en hembras seudopreñadas. Un promedio de 20% de los ratones que nacen llevarán el gen modificado integrado en su genoma (figura 28-6). Es importante mencionar que mediante esta técnica, utilizando células madre embrionarias, pueden obtenerse directamente ratones *knockout* homocigotos.

Las regiones de homología que se encuentran en cada extremo del vector deben ser idénticas a las secuencias blanco en el genoma que rodea el gen de interés. En estos dos puntos de homología el vector se recombina en el genoma mediante *recombinación homóloga*, para cambiar el gen que se encuentra en el genoma por el gen alterado contenido en el vector (figura 28-7); sin embargo, es posible que el vector se inserte en el genoma en el lugar equivocado. Para asegurarse de que esto no suceda, el gen de la timidina cinasa (*TK*) se agrega al vector fuera de la región de homología, y la proteína producida por este gen metaboliza al fármaco ganciclovir y genera un compuesto citotóxico. Si la recombinación homóloga se ha llevado de forma correcta, el gen *TK* no estará en el genoma de las células y éstas serán insensibles al ganciclovir. Sin embargo, si el vector se ha insertado completo en el genoma, la célula contendrá en su genoma el gen *TK* y la célula morirá cuando se cultive en ganciclovir. La inserción completa del vector puede deberse al tamaño de las regiones homólogas a recombinarse o a la similitud de las secuencias homólogas del vector y de las secuencias diana. La forma de verificar si el vector se insertó en el sitio correcto es realizando un análisis de la expresión del gen y de la funcionalidad de la proteína que se modificó una vez que el animal nació.

Técnicas para identificar a un animal transgénico

En el proceso de generar un animal transgénico es de suma importancia saber que el gen de interés se ha incorporado al

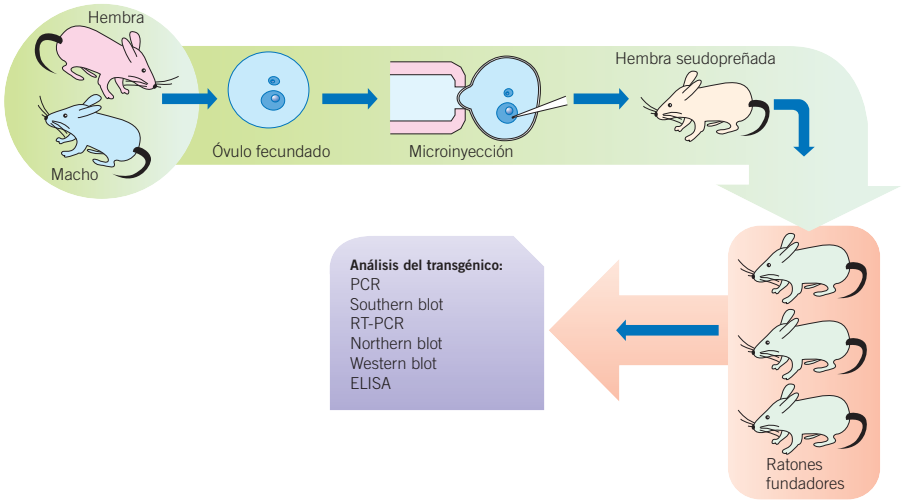


Figura 28-5. Proceso de generación de un ratón transgénico. Para generar un ratón transgénico se parte de la obtención de varios óvulos fecundados; el transgén de interés es inyectado en el pronúcleo masculino de cada uno de ellos. Posteriormente, se implantan de 10 a 20 ovocitos en una hembra seudopreñada, y 19 a 21 días después nacen las crías a las cuales se les realiza el análisis para determinar si se integró el transgén.

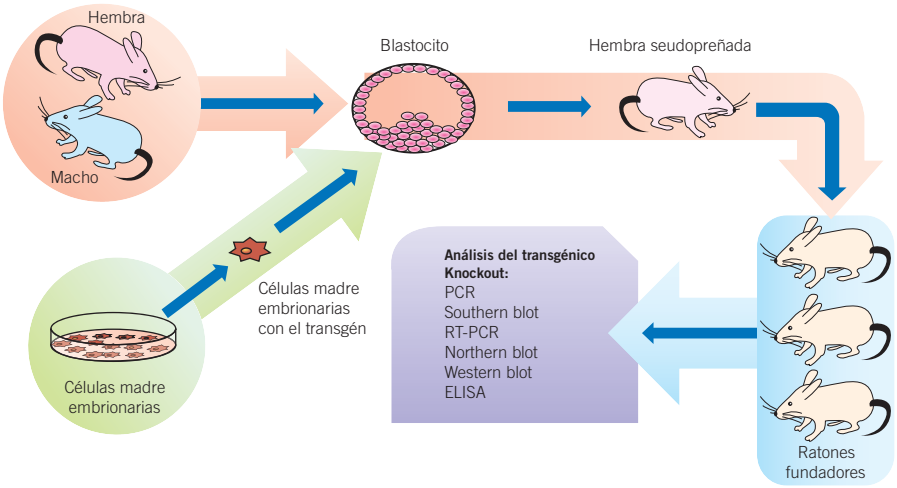


Figura 28-6. Generación de un ratón *knockout*. Se obtiene el blastocito de una hembra preñada; el transgén con el gen no funcional es inyectado en células madre embrionarias. Posteriormente, las células con el transgén se inyectan en el blastocito, que se implanta en una hembra seudopreñada y después de 19 a 21 días nacen las crías a las cuales se les realiza el análisis para determinar si se integró el transgén.

material genético del animal. Los avances tecnológico-científicos han permitido desarrollar un gran número de métodos para el análisis de la incorporación de secuencias de ADN en un genoma que no las contenía, así como tecnologías que permiten analizar el nivel de la expresión del transgén en el ARNm o de la proteína. Para este fin, en el cuadro 28-2 se describen los métodos de acuerdo con el tipo de análisis que se requiere:

a) Técnicas que analizan el ADN: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Southern blot.
b) Técnicas que analizan ARN: RT-PCR y Northern blot.
c) Técnicas que se encargan del análisis de la proteína: Western blot y ensayo inmunoabsorbente directo ligado a enzimas (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*, ELISA).

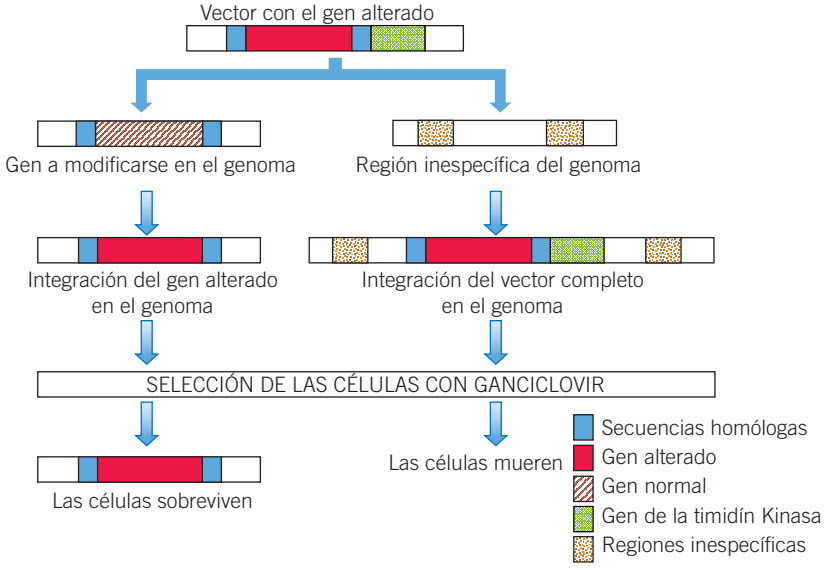


Figura 28-7. Generación de un ratón *knockout*. El vector se construye con la secuencia alterada del gen de interés, que contiene dos regiones homólogas una a cada extremo; estas regiones también se encuentran en los extremos del gen que se quiere eliminar en el genoma. De la misma manera, contiene el gen de la timidina cinasa fuera de las regiones de homología. El vector se inserta en el genoma por recombinación homóloga, si no se integra en la región específica; al agregar ganciclovir al medio donde se encuentran las células, éstas mueren ya que contienen el gen de la timidina cinasa.

Cuadro 28-2. Técnicas utilizadas para el análisis de animales transgénicos.

Técnica	Molécula que analiza		
	ADN	ARN	Proteína
PCR			
Southern blot			
Northern blot			
RT-PCR			
Western blot			
ELISA			

Reacción en cadena de la polimerasa

Este método sirve para la identificación del ADN del transgén mediante la amplificación de un fragmento de éste. Su utilidad reside en que es una técnica rápida, sencilla y relativamente barata. El resultado exitoso de la técnica tiene que ver con el diseño minucioso de los iniciadores, o *primers*, que flanquean el fragmento que se va a amplificar, los cuales deben ser específicos para el transgén que se está analizando. Cabe señalar que los fragmentos amplificados deben visualizarse mediante la técnica de electroforesis en agarosa después de teñirse. Para este análisis generalmente se toma una muestra de tejido de la cola del ratón o una biopsia lo menos invasiva para el animal.

Southern blot

Esta técnica permite la identificación de secuencias específicas de ADN, separándolas por tamaño mediante electroforesis en gel y localizándolas por hibridación de sondas específicas marcadas que son complementarias con elADN que se desea encontrar. El ADN genómico que se va a analizar se corta con enzimas de restricción para producir fragmentos de diferente tamaño. Los fragmentos se separan por su tamaño molecular mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez terminada la electroforesis, los fragmentos de ADN se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o nailon, que actúa como un soporte sólido. Para que la sonda hibride, el ADN de doble cadena debe desnaturalizarse en hebras sencillas y fijarse a la membrana por acción de luz ultravioleta (UV). La sonda con secuencia complementaria a la del fragmento del gen que se quiere localizar en el genoma se marca radiactivamente o con fluorocromos y se pone a hibridar con los fragmentos de ADN fijados en la membrana. Después de la hibridación y lavados, los fragmentos se detectan por autorradiografía o mediante fluorescencia (en caso de marcaje no-radiactivo). Si el gen se ha integrado al genoma del transgénico que se está creando, el análisis de la marca será positivo.

Northern blot

Es una técnica que permite la identificación de secuencias específicas de ARN, en general ARNm. Después de la extracción del ARN del tejido donde quiere detectarse el ARNm del transgén, el ARN se somete a electroforesis en gel de agarosa para su separación por tamaño. Una vez terminada la electroforesis, y sin teñir el gel, los fragmentos se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de nailon. El ARN se fija en la membrana con luz UV y la membrana se incuba con la sonda marcada específica para la secuencia que se desea identificar. Después de la hibridación, y lavados los fragmentos complementarios a la sonda, se detectan por autorradiografía o mediante fluorescencia (en caso de marcaje no-radiactivo). Si se expresa el transgén que se incorpora al animal se detectará su ARNm.

RT-PCR

Esta técnica es útil para el análisis de la expresión del transgén en el ARNm. Es una modificación de la PCR que incluye una extracción de ARN, una retrotranscripción mediante transcriptasa inversa, la formación de un ADN de doble cadena y, posteriormente, la PCR con *primers* específicos para el transgén. Por último, se realiza el análisis del fragmento amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa.

Western blot

Este método permite analizar la expresión del transgén en la proteína. La proteína transgénica se separa de la mezcla proteica celular mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas separadas por peso molecular se transfieren del gel a una membrana de nitrocelulosa. Pos-

teriormente, se añade un anticuerpo marcado específico contra la proteína transgénica a la membrana. La proteína de interés se detecta por autorradiografía o fluorescencia (en caso de marcaje no-radiactivo).

ELISA

Este método permite analizar la expresión del transgén en la proteína y se fundamenta en una reacción antígeno-anticuerpo, entre un anticuerpo específico contra la proteína que genera el transgén, unido a un soporte sólido, generalmente un pozo de una placa de 96 pozos. Al añadir la mezcla proteica, el anticuerpo reconoce la proteína de interés y, mediante una serie de reacciones químicas, se forma un metabolito detectable que genera un cambio de color. Este producto indica de manera indirecta la presencia de la proteína, lo que permite su cuantificación (ver el cuadro 28-2).

Aplicaciones de los animales transgénicos

a) **Modelos de enfermedad.** Es posible introducir alteraciones en los genes de animales con la finalidad de provocar una enfermedad similar a la que se presenta en el ser humano. Estos modelos animales generados transgénicamente aportan grandes ventajas comparadas con los ensayos clínicos, ya que en los estudios con humanos resulta muy difícil el apego a tratamientos y a indicaciones médicas; sin embargo, en los modelos animales estas variables son controladas. Además, estos modelos permiten tener periodos de observación más prolongados para estudiar el desarrollo de las enfermedades y análisis de tratamientos, ya que cuando se trata con pacientes el seguimiento es difícil, sobre todo cuando éstos son ambulatorios. Con esta premisa, se han generado cerdos transgénicos como modelo de retinitis pigmentosa y de enfermedad de Alzheimer, así como ovejas transgénicas como modelo de fibrosis quística. Los animales transgénicos no sólo permiten estudiar la progresión natural de varias enfermedades sino también evaluar nuevas estrategias terapéuticas de una forma imposible de realizar en seres humanos. La generación de animales transgénicos es imprescindible para el estudio *in vivo* de la función y la regulación de la expresión de genes para el estudio del estado de salud y el desarrollo de la enfermedad.
b) **Mejora del ganado.** La biotecnología ha alcanzado a los productores de alimento, los cuales, mediante técnicas de ingeniería genética, han modificado a los animales de cría de forma que tengan un crecimiento más rápido, desarrollen menos grasa, metabolicen los alimentos de forma más eficaz y resistan las enfermedades.
c) **Producción de proteínas recombinantes.** Los sistemas de producción de proteínas recombinantes deben tener la capacidad de producir grandes cantidades, biológicamente activas e idénticas a las endógenas. A pesar del bajo costo de producir proteínas recombinantes en bacterias y levaduras, estos microorganismos no realizan varias de las modificaciones postraduccionales requeridas para la correcta función *in vivo* de las proteínas de interés. Las proteínas recombinantes de interés biomédico pueden sintetizarse en fluidos biológicos, como sangre, orina, líquido seminal, saliva y leche, en función del promotor que se coloque en la construcción del transgén. No obstante, el vehículo de elección para la expresión de proteínas de valor biomédico en animales transgénicos es la leche, debido a la gran cantidad que se puede obtener y a la facilidad de la recolección (la glándula mamaria puede expresar más de 2 g de proteína recombinante por litro de leche). Como existen proteínas que sólo se expresan en la leche (como la caseína, la lactoglobulina y la proteína acídica del suero), si el gen de una proteína humana de interés se introduce por recombinación homóloga bajo el promotor de una de estas proteínas, se obtendrá la expresión de la proteína recombinante deseada en la leche del animal transgénico.

En la actualidad, muchas proteínas activas se han producido con animales de granja transgénicos funcionando como biorreactores. Entre las más destacadas cabe mencionar al activador tisular del plasminógeno (tPA), utilizado en pacientes con trombosis y producido en la leche de cabras transgénicas. En la leche de ovejas transgénicas se obtuvo la expresión de alfa-antitripsina para el tratamiento del enfisema pulmonar y de la fibrosis quística, así como la de los factores de coagulación VIII y IX para tratar la hemofilia A y B, respectivamente. La leche de conejos transgénicos se está utilizando para la producción de calcitonina para el tratamiento de la osteoporosis y la hipercalcemia. En la leche de vacas transgénicas se están sintetizando anticuerpos policlonales humanos y lactoferrina humana, entre otras proteínas de alto valor biomédico.

Clonación

Para entender el concepto de clonación en un laboratorio, pueden observarse dos ejemplos claros de clonación en la naturaleza: a) clonación unicelular, y b) clonación de organismos multicelulares. En el hígado de un adulto ocurre un fenómeno importante de regeneración después de recibir un daño agudo. Los hepatocitos son células totalmente diferenciadas (se encuentran en etapa G0 del ciclo celular), las cuales al recibir el estímulo para dividirse entran en la etapa G1 del ciclo celular y generan dos células hijas por cada hepatocito en división. Las células obtenidas se encuentran diferenciadas a hepatocitos; es decir, es un proceso natural para obtener dos clonas idénticas del hepatocito original para no perder la funcionalidad del hígado.

Por otro lado, existe un fenómeno poco explicado que ocurre inmediatamente después de la fecundación del óvulo por un espermatozoide en ciertas condiciones. En lugar de

que esta célula se divida para obtener un organismo multicelular, ocurre una división celular que origina dos células que darán como resultado dos organismos multicelulares, o clones; a estos organismos clonados se les denomina *gemelos idénticos* o *mellizos*; es decir, genotípicamente idénticos. Este fenómeno es poco común y se da en diferentes especies.

Para clonar a un organismo multicelular es necesaria una célula que contenga todo su genoma, por lo que la clonación de laboratorio puede definirse como el proceso por el que se consiguen de modo asexual (sin la aportación de los dos gametos) individuos idénticos a un organismo adulto. El individuo que se obtiene posee la misma identidad genómica que el donante del núcleo.

Clonación humana

El desarrollo de tecnologías de clonación de organismos multicelulares ha llevado al hombre a imaginar hipótesis inspiradas en el deseo de mejorar la especie humana, como son: multiplicar individuos dotados de un gran ingenio, bellezas excepcionales, selección de individuos sanos e inmunes a enfermedades genéticas, posibilidad de selección del sexo, obtención de órganos para trasplantes y reproducción de familiares difuntos.

Aunque por medio de la clonación se obtendrían individuos genéticamente idénticos, el desarrollo psicológico, la cultura y el ambiente conducen siempre a personalidades diversas, por lo que *clonación* no significa *identidad del individuo*. Este hecho fue plasmado en el cine en 1978, en la película *Los niños del Brasil*, del director Franklin J. Schaffner, basada en una novela del escritor Ira Levin. En dicha historia se generaron más de 90 clones de un individuo; lo interesante de esto es que el experimento no culmina con la clonación sino que comienza un proceso de adaptación al colocar a estos clones en el seno de familias muy parecidas a las del individuo clonado. Esto tiene el objeto de inducir vivencias similares para generar no solamente la igualdad genómica sino también establecer la misma identidad del individuo, lo cual es imposible de lograr en la realidad. Los aspectos éticos con respecto a las demás premisas para clonar a un individuo deben tomarse con mucha responsabilidad.

Clonación animal

Como es conocido por todo el mundo, el objetivo principal de la clonación animal es económico: mejora de la productividad y calidad de la ganadería y la agricultura, así como producción de proteínas de interés médico mediante la multiplicación de animales transgénicos. Por mencionar algunos ejemplos, al encontrarse con un espécimen de alta calidad en un rebaño, lo lógico es que se quisiera tener el mismo ejemplar en grandes cantidades, pero por desgracia junto con las cualidades también se acarrean ciertas deficiencias. Cuando se tiene variedad genética en un rebaño y éste se ve afectado por una infección, pueden resultar afectados un gran número de individuos; sin embargo, si todos son clones, lo más probable es que se vea afectado todo el rebaño. En el caso de la creación de animales transgénicos, como ya se analizó, el transgén que se introduce puede intercalarse en el genoma de manera azarosa en número y en sitios, por lo que todos los animales transgénicos de expresión son diferentes entre sí, aun cuando expresan la proteína del transgén, por lo que tener la posibilidad de clonar a un espécimen de buena calidad resultaría en un gran beneficio económico.

Clonación de la oveja *Dolly*

Para lograr clonar a la oveja *Dolly* se llevaron a cabo los siguientes pasos: se obtuvieron y cultivaron *in vitro* células de la glándula mamaria (la ubre) de una oveja adulta de raza Finn Dorset (oveja con cara blanca); estas células somáticas diferenciadas y en fase G0 de ciclo celular se fusionaron con óvulos a los que previamente se les había extraído el núcleo (óvulos anucleados), provenientes de una oveja de raza Scottish Blackface (con cara negra). A estos óvulos, a los cuales se les introdujo el material genético proveniente del núcleo de células mamarias, se les activó utilizando una leve descarga eléctrica, induciéndolas a dividirse. Cuando los embriones llegaron a poseer entre ocho y 16 células (estadio de mórula), se implantaron en el útero de otras ovejas Scottish Blackface. Transcurridos 148 días nació un cordero de 0.6 kg de peso, totalmente blanco, al cual posteriormente se le llamó *Dolly* (figura 28-8), el primer mamífero obtenido a partir de una célula tomada de un individuo adulto. La oveja *Dolly* nació el 5 de julio de 1996; su nacimiento fue anunciado siete meses después, el 23 de febrero de 1997, y murió el 14 de febrero de 2003. Sus creadores fueron los científicos del Instituto Roslin de Edimburgo (Escocia), Ian Wilmut y Keith Campbell. Para llegar hasta *Dolly* se usaron 277 embriones, lo que significa 277 experimentos diferentes. Estudios moleculares demostraron que la dotación genética del cordero clonado era idéntica a la de la oveja de la cual se extrajeron las células de la glándula mamaria, y diferente de la de la oveja utilizada como nodriza.

Preguntas de repaso

1. ¿Qué son los organismos genéticamente modificados?
2. ¿Qué es un transgén?
3. ¿Qué diferencia existe entre un organismo transgénico y uno *knockout*?
4. ¿Por qué los animales transgénicos en su primera generación son siempre heterocigotos para el transgén que se les añade?
5. ¿Cuál es la utilidad de generar animales transgénicos?
6. ¿Qué técnica de laboratorio se utilizaría si se requiere saber si el transgén se integró al genoma del animal?
7. ¿Qué técnica utilizaría para saber que el transgén se está expresando?

Bibliografía

Boyd A.L., Samid D. Molecular biology of transgenic animals. *J Anim Sci*, 1993;71:1-9.

Cavagnari B.M. Generación de animales transgénicos. Regulación de la expresión genética. *Arch Argent Pediatr*, 2010;108:438-444.

Gordon J., Scangos G., Plotkin D., Barbosa J., Ruddle F. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980;77:7380-7384.

Majzoub J.A., Muglia L.J. Knockout mice. *N Engl J Gene Med,* 1996;4:904-907.

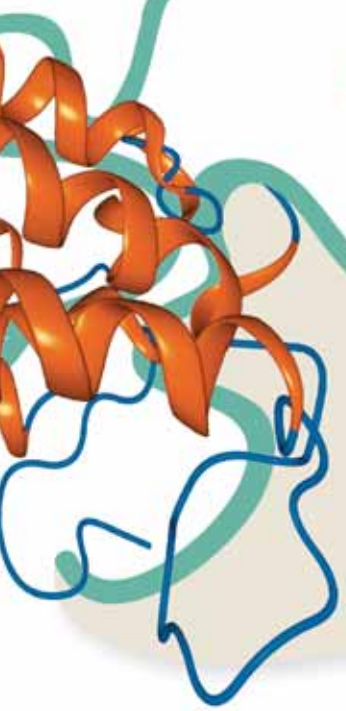
Meissner A., Jaenisch R. Mammalian Nuclear Transfer. *Dev Dynamics*, 2006;235:2460–2469.

Melo E.O., Canavessi A.M.O., Franco M.M., Rumpf R. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet,* 2007;48:47-61.

Redwan R.M. Animal-derived pharmaceutical proteins. *J Immunoassay Immunochem*, 2009;30:262-290.

Roopenian D., Christianson G., Sproule T. Human FcRn transgenic mice for pharmacokinetic evaluation of therapeutic antibodies. *Methods Mol Biol*, 2010;602:93-104.

Salamone D., Barañao L., Santos C., Bussmann L. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol*, 2006;124:469-72.



Capítulo 29

Nutrigenómica y nutrigenética

Blanca Estela Bastidas Ramírez / Jesús Javier García Bañuelos
Elizabeth Gordillo Bastidas / Daniela Gordillo Bastidas

Introducción

El avance de la biología molecular en los últimos 20 años, favorecido por la implementación de técnicas del ADN recombinante y los resultados del Proyecto del Genoma Humano, ha impactado en las ciencias biológicas, como la medicina y la nutrición. Estos conocimientos han conducido a un cambio de paradigmas, a una redefinición de conceptos y al desarrollo de nuevas disciplinas. La nutrición es un factor clave del ambiente ante el cual el individuo está continuamente expuesto. La frase de Hipócrates (460-370 a. C.): "Que la comida sea tu alimento y el alimento tu medicina", cobra ahora importancia desde un nivel del conocimiento más profundo, que permite comprender que cada individuo representa una expresión de genes particular condicionada por su estructura génica y el ambiente al que está expuesto, en donde la nutrición desempeña un papel preponderante. En este contexto, ha surgido la nutrición molecular, que dirige a conocer y emplear los componentes bioactivos de los alimentos para evitar enfermedades o conservar la salud, tomando en cuenta la constitución génica y las variaciones particulares que presentan grupos específicos de individuos.

Nutrición molecular: nutrigenómica y nutrigenética

La nutrición molecular es una ciencia constituida por dos ramas: la nutrigenómica y la nutrigenética; ambas van de la mano, una no puede excluir a la otra.

La nutrigenómica estudia los efectos de los componentes de la dieta sobre la modulación de la expresión génica de un individuo, y la nutrigenética es el estudio de la expresión de los genes en respuesta a nutrientes específicos, pero condicionada por las variantes génicas individuales. En otras palabras, la nutrición molecular se desarrolla en dos direcciones: una que estudia la influencia de los nutrimentos sobre la expresión de los genes, y otra que estudia la influencia de las variaciones génicas en la respuesta del organismo a los nutrimentos, como se esquematiza en la figura 29-1.

Fundamentos de la nutrición molecular, objetivos y avance científico

El desarrollo de la nutrición molecular se fundamenta en los siguientes conocimientos:

a) La expresión de los genes es lo que define el estado de salud-enfermedad de un individuo.
b) La constitución génica confiere a cada individuo un perfil de expresión de susceptibilidad o protección ante agentes exógenos y procesos endógenos del organismo.
c) La estructura primaria de los genes y el ambiente son los factores que determinan la expresión génica.
d) La nutrición constituye la variable ambiental modificable más importante que tiene la capacidad de modular la expresión de los genes.
e) Los genes predisponen, pero el ambiente determina.

La nutrición molecular guarda una estrecha analogía con la farmacología molecular en lo que se refiere al enfoque científico y las herramientas de estudio que se emplean, ya que ambas disciplinas estudian la respuesta del organismo a moléculas de origen exógeno. La farmacología molecular estudia el mecanismo de acción de moléculas aisladas, a bajas concentraciones, que generalmente actúan con una afinidad y una selectividad elevadas para una cantidad limitada de blancos biológicos. Sin embargo, la nutrición molecular representa un grado mucho mayor de complejidad, dado que el organismo debe manejar una gran cantidad de componentes a la vez, cuya concentración puede ser eleva-

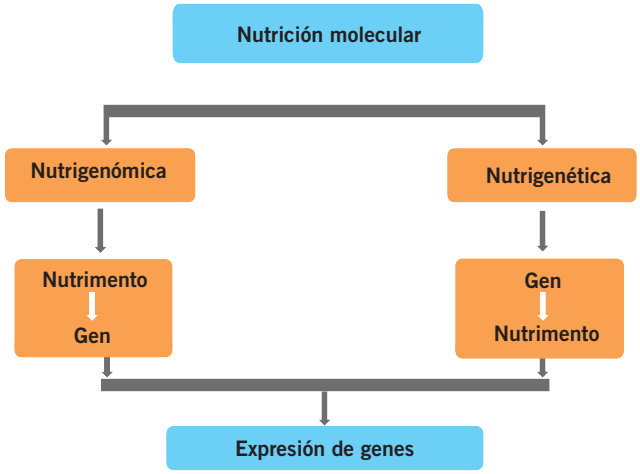


Figura 29-1. Nutrición molecular. La nutrigenómica estudia la influencia de los nutrimentos sobre la expresión génica del individuo, y la nutrigenética, el efecto de las variaciones genéticas en la respuesta del organismo a los nutrimentos.

da, sin alcanzar niveles tóxicos. Además, cada nutrimento puede tener varios blancos biológicos, con una afinidad y una especificidad diferentes.

Los alimentos que se ingieren contienen numerosas sustancias biológicamente activas, de las cuales algunas son potencialmente benéficas para la salud, mientras que otras pueden ejercer un efecto perjudicial en condiciones especiales. Se dispone de reportes científicos que señalan la asociación de algunos alimentos o cantidades de ellos con el desarrollo o agravamiento de afecciones específicas, así como otros que describen el mecanismo molecular de la acción benéfica de algunos nutrimentos. Dilucidar con exactitud el componente de la dieta responsable de una respuesta particular resulta una tarea difícil, para lo cual se utilizan la tecnología de microarreglos, los animales transgénicos, los cultivos celulares y el estudio de polimorfismos, mutaciones y cambios epigenéticos.

Los principales objetivos de la nutrición molecular son la búsqueda de alternativas nutricionales para frenar la prevalencia creciente de las enfermedades crónicas degenerativas, que dependen de forma parcial de la exposición a diversos componentes de los alimentos durante periodos prolongados y a sus efectos moduladores, así como el análisis del efecto provocado por algunos alimentos en función de variantes génicas individuales.

En la actualidad se conoce que algunos nutrimentos se unen de forma directa o afectan de manera indirecta a los factores de transcripción, los cuales regulan la expresión de genes específicos. Las vías descritas con más frecuencia son las involucradas en el metabolismo de lípidos, el estrés oxidativo y los errores innatos del metabolismo.

A continuación, se ejemplifican algunas interacciones nutrimento-gen y gen-nutrimento para comprender mejor los efectos moduladores de la dieta.

Interacciones nutrimento-gen

Las interacciones nutrimento-gen son el objeto de estudio de la nutrigenómica. En los últimos años, se ha descrito el efecto molecular de numerosos componentes de los alimentos, tratando de explicar el beneficio o perjuicio resultante de su consumo. En la figura 29-2 se observa la estructura química de algunos nutrimentos presentes en diversos alimentos, cuya función molecular se explica a continuación.

Galato de epigalocatecina

El té verde forma parte de la dieta oriental cotidiana, y Japón se ha catalogado como uno de los países con un mayor índice de longevidad, para lo cual la nutrición ha contribuido de manera significativa. El galato de epigalocatecina (EGCG) es el principal componente del té verde, responsable de los efectos benéficos que se le atribuyen. Este compuesto pertenece al grupo de los flavonoides, que son pigmentos vegetales, metabolitos secundarios de las plantas. Se sintetizan a partir de una molécula de fenilalanina y tres moléculas de malonilCoA. Los flavonoides están presentes en frutas, verduras y bebidas derivadas de éstas, y el consumo de alimentos y bebidas ricas en flavonoides, como el té verde, se ha asociado a una baja incidencia de cáncer. Se han propuesto varios mecanismos de acción molecular *in vivo* e *in vitro* que explican el efecto de EGCG sobre la inhibición del crecimiento, invasión, metástasis y angiogénesis de células tumorales. El EGCG bloquea el crecimiento de células tumorales mediante la inhibición de la actividad de la telomerasa, y regula de forma negativa la región promotora del gen, con la subsecuente fragmentación de los telómeros. Asimismo, el EGCG incrementa la expresión de proteínas

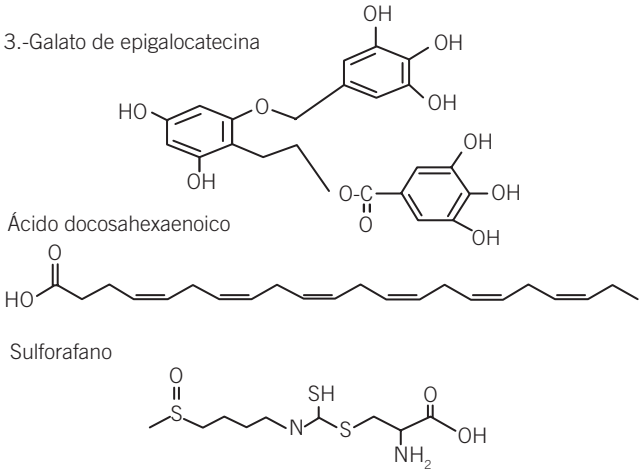


Figura 29-2. Estructura molecular de algunos compuestos estudiados en protocolos de investigación en nutrigenómica como el 3-galacto de epigalocatecina, el ácido docosahexaenoico y el sulforafano.

como p53 y p21, que detienen la replicación de células con genoma alterado para promover su reparación. En el caso de que el daño sea irreparable, p53 y p21 inducen la expresión de las enzimas caspasas, cuya función es llevar a cabo el proceso de apoptosis, o muerte celular programada. El EGCG impide la metástasis tumoral mediante la interferencia de la síntesis de urocinasa y metaloproteinasas. El EGCG también ejerce un efecto inhibitorio de la angiogénesis a través de la disminución de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular C (*vascular endotelial growth factor C*, VEGFC) y del bloqueo de la fosforilación de su receptor tipo 2 (VEGFR2), para impedir su activación. Por otro lado, el EGCG ejerce un efecto antioxidante y antiinflamatorio a través de la disminución de moléculas oxidantes, como los radicales libres, el óxido nítrico y la IL-6. Estas moléculas presentan la capacidad de activar las cinasas (IkK) que fosforilan el inhibidor (IkB) del factor nuclear kappa B (NF-κB), un factor transcripcional que posee una región de localización nuclear que le permite ser transportado al núcleo cuando es liberado del IkB fosforilado. Una vez en el núcleo, el NF—κB interactúa con el promotor de genes proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y la IL-6, para promover su expresión. Es decir, la presencia de EGCG disminuye la actividad de la IκK, bloqueando la translocación nuclear de NF-κB, y da como resultado un efecto antiinflamatorio (figura 29-3).

Recomendaciones nutricionales

En la literatura se menciona que el consumo de 100 a 300 mg de flavonoides al día puede prevenir el desarrollo de procesos patológicos. Una taza de té verde (240 ml) contiene aproximadamente 334 mg de EGCG, aunque existen otras fuentes nutricionales de flavonoides (100 g de pimiento amarillo, uvas, naranjas contienen 58, 55 o 44 mg de flavonoides, respectivamente).

Ácido docosahexaenoico

El pescado es un elemento de la dieta ampliamente recomendado por su alto valor nutricional. En la actualidad, el empleo de modelos experimentales *in vivo* ha hecho posible dilucidar el efecto de algunos de sus componentes sobre la expresión de genes. El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso poliinsaturado esencial, cuya nomenclatura química es 22:6(n-3), por tener una cadena de 22 carbonos, con 6 enlaces dobles *cis* a partir del carbono 3, por lo que pertenece al grupo de ácidos grasos omega 3 (figura 29-2). Su fuente dietética son los peces que habitan en aguas frías, como la trucha o el salmón, los cuales reservan grasa, y principalmente grasas insaturadas, para mantener su temperatura corporal.

Algunos estudios epidemiológicos muestran asociación entre el consumo de pescado y una baja incidencia de cáncer. En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado el efecto modulador del DHA en la expresión de genes que participan en la replicación y la muerte celular. Algunos experimentos realizados en células de cáncer de mama revelan que el DHA altera la estabilidad de la membrana plasmática y aumenta el nivel de insaturación de los ácidos grasos contenidos en ella; además, modifica la señalización celular, lo cual promueve la expresión de Bcl2 y procaspasa 8, mediadoras de apoptosis.

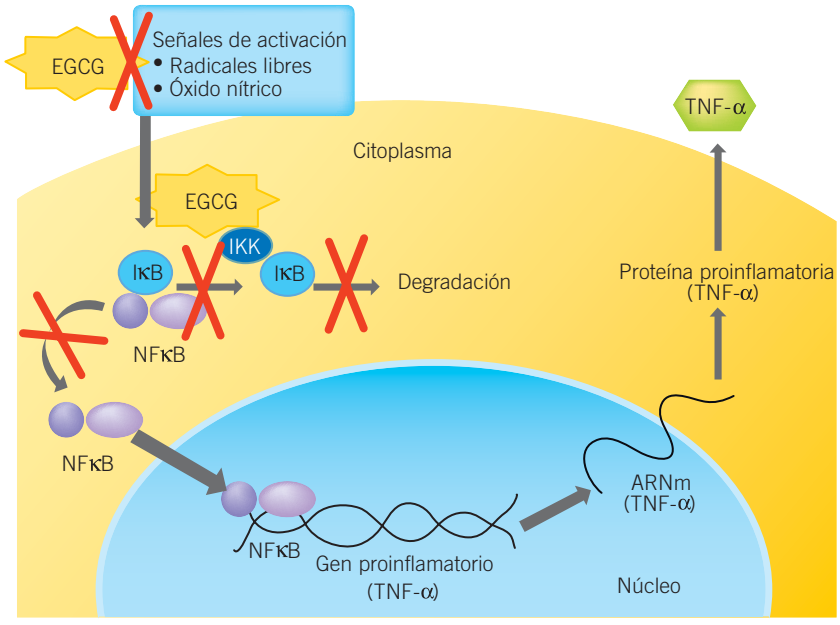


Figura 29-3. Mecanismo de acción del 3-galacto de epigalocatecina (EGCG). El EGCG impide la fosforilación de IkB, inhibiendo la cascada de señalización de NF-kB y la expresión de proteínas proinflamatorias; por tanto tiene un efecto antiinflamatorio.

Asimismo, el DHA activa la vía de las caspasas 3 y 9, y propicia la apoptosis de las células que presentan mutaciones irreparables. El DHA disminuye la expresión de β-catenina, proteína con actividad de cinasa, capaz de fosforilar y activar factores transcripcionales e inducir la expresión de diversos protooncogenes, principalmente *c-myc*. El aumento de la expresión de β-catenina se asocia a genes inductores del ciclo celular en el desarrollo de la poliposis adenomatosa familiar, por lo que se han realizado estudios con DHA en pacientes con este padecimiento, en los que se han reportado resultados alentadores. Por otro lado, el DHA, por ser un ácido graso poliinsaturado, desempeña un papel antioxidante protector en la reposición de lípidos de membrana que han sido dañados por efecto de los radicales libres.

Recomendaciones nutricionales

En la literatura se menciona que el consumo de 400 mg/kg de peso de DHA al día es preventivo para el desarrollo de cáncer de mama y de próstata en modelos *in vivo.* En humanos, esta cantidad sólo puede obtenerse por suplementación.

Sulforafano

Diversos estudios epidemiológicos asocian el consumo de vegetales con una baja incidencia de cáncer, por lo que se ha recomendado como parte de una dieta saludable. Algunos compuestos, como el sulforafano (SFN), han mostrado un efecto modulador en la expresión de genes, y su utilidad en la anticarcinogénesis se ha comprobado en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. El SFN pertenece al grupo de los isotiocianatos, como se muestra en la figura 29-2, los cuales se sintetizan y almacenan en plantas como precursores estables inactivos, conocidos como glucosinolatos. Los glucosinolatos, al ser hidrolizados por la enzima mirosinasa a isotiocianatos, se convierten en moléculas activas. Las verduras crucíferas, como la coliflor, las colecitas de brucelas, la col, el brócoli y, sobre todo, el brócoli germinado, son sus fuentes dietéticas más abundantes.

El SFN se ha catalogado como un inhibidor (HDACi) de las enzimas desacetiladoras de histonas (HDAC). Cabe recordar que las histonas son proteínas que se encuentran unidas al ADN empaquetado y que su estado de acetilación/desacetilación desempeña un papel preponderante en la expresión de genes. De una manera simplista, puede decirse que cuando las histonas están acetiladas se disocian del ADN y los factores transcripcionales interactúan con sus elementos de respuesta en el ADN e inducen la transcripción de genes. Cuando las histonas se desacetilan, el ADN vuelve a empaquetarse en éstas y cesa la transcripción. El mecanismo molecular del SFN como HDACi no se conoce con precisión; sin embargo, se infiere que se une al sitio catalítico de las HDAC e impide que ésta lleve a cabo su función de desacetilación, lo que permite, en consecuencia, la expresión de genes. En diferentes estudios se ha observado que el SFN específicamente aumenta la acetilación de las histonas H3 y H4 en el promotor de *p21,* y elimina la represión de los genes *p21* y *Bax*, que codifican proteínas de arresto de ciclo celular y apoptosis, respectivamente, por lo que evita la proliferación de células cancerígenas (figura 29-4).

El consumo de SFN se ha relacionado con la disminución del tamaño de tumores a través de la inducción de muerte celular apoptótica causada por la inducción de caspasa 3, acompañada de una sobrerregulación de *Bax* y la subregulación de las proteínas Bcl-2 y Bcl-x_L. También se ha sugerido que la muerte celular inducida por SFN podría estar mediada por estrés oxidativo, ya que se demostró inhibición por la N-acetil-cisteína y la catalasa, que son fuertes antioxidantes.

Recomendaciones nutricionales

El consumo de 68 g de germinado de brócoli (una taza de 240 ml), que contienen aproximadamente 105 mg de SFN, podría tener un efecto preventivo en cáncer en humanos. Se necesitaría consumir más de medio kilogramo de brócoli maduro para obtener la misma cantidad de SFN.

Otros nutrimentos

Existen otros nutrimentos en la dieta, cuyos requerimientos normales son aparentemente bajos, como los carotenoides, la vitamina C, el ácido fólico, el cinc y la vitamina E, entre otros. Sin embargo, no por eso dejan de participar de manera importante en la modulación de la expresión génica.

Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos vegetales que, al ser metabolizados, generan retinoides. Tienen la capacidad de disminuir el daño oxidativo ocasionado en el ADN por los radicales libres superóxido y peróxido de hidrógeno, al aumentar la expresión de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa. Los radicales libres son capaces de inducir una respuesta inflamatoria a través de la activación de la cascada de señalización de NFkB, por lo que a los carotenoides también se les atribuye una acción antiinflamatoria.

Por otro lado, se ha demostrado el efecto hipoglucemiante de estos compuestos. Su fuente dietética está constituida por alimentos coloreados (amarillos, naranjas, verdes, rojos), tales como jitomate, zanahoria o espinacas. Se recomienda un consumo diario de carotenoides de 24 mg/día, que pueden obtenerse por combinación de alimentos. Esta cantidad de carotenoides se encuentra en seis tazas de zanahoria, cuatro piezas de jitomate o una taza y media de espinacas, por mencionar algunas fuentes.

Vitamina C

La deficiencia de vitamina C causa aumento en la oxidación del ADN de células somáticas y germinales en el humano, un proceso que ocurre con más frecuencia en los residuos de guanina por presentar un potencial de oxidación mayor que las otras bases nitrogenadas. Este proceso oxidativo se asocia con enfermedades como el cáncer.

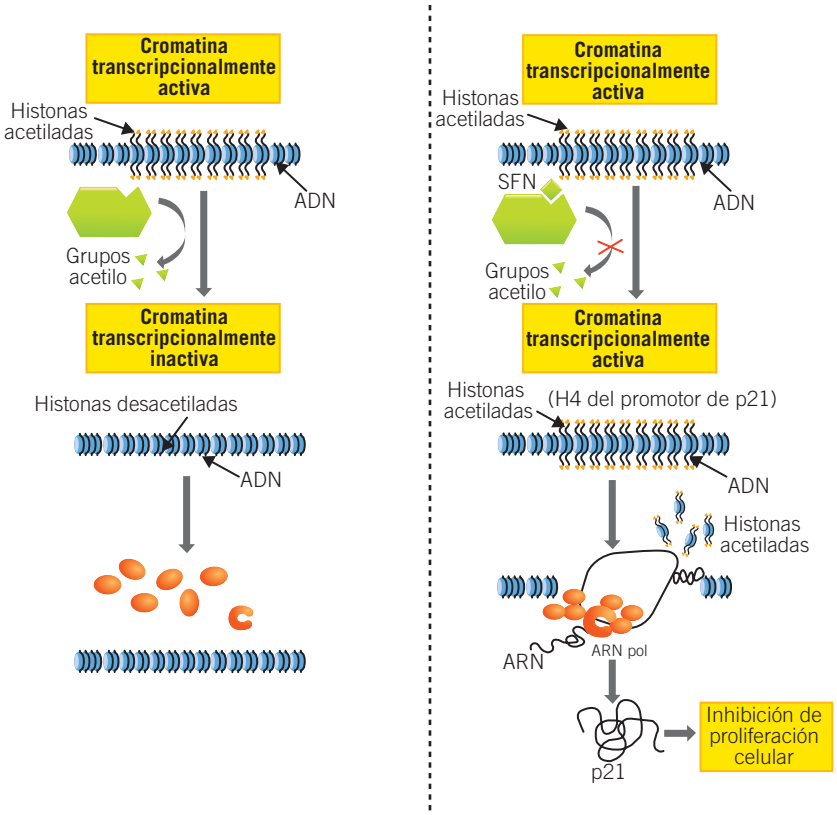


Figura 29-4. Efecto modulador del sulforafano (SFN) en la expresión de genes. El SFN, al unirse al sitio catalítico de una HDAC, promueve la acetilación de histonas y favorece la expresión de los genes p21 y Bax, involucrados en arresto de ciclo celular y en apoptosis, respectivamente.

Asimismo, la deficiencia de vitamina C se ha asociado a la alteración de las glucosidasas reparadoras del ADN que eliminan las bases dañadas. La dosis recomendada es de 60 mg/día. Algunos alimentos con altos contenidos de vitamina C son el brócoli, el chile poblano, el kiwi, la naranja y la guayaba.

Ácido fólico

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble, cuya deficiencia causa defectos de cierre del tubo neural en la etapa fetal, relacionados de forma directa con el aumento del daño al genoma. Su carencia aumenta el riesgo de presentar leucemia en hijos de madres con suplementación inadecuada durante el embarazo. Además, su deficiencia provoca la incorporación de uracilo en lugar de timina en la síntesis del ADN, lo que altera la metilación de las islas CpG en el ADN y ocasiona una reparación inadecuada del mismo.

La cantidad de consumo recomendada es 400 µg/día. Algunos alimentos con altos contenidos de ácido fólico son las espinacas, el hígado de pollo, el frijol bayo, los garbanzos, las habas y las lentejas.

Cinc

El cinc es un metal que participa como cofactor enzimático en diversas reacciones bioquímicas y que desempeña un papel importante en el funcionamiento del sistema inmunológico y en el metabolismo de los hidratos de carbono. Los alimentos ricos en proteínas contienen grandes cantidades de cinc. Las carnes de res, cerdo y cordero contienen mayor cantidad de cinc que el pescado y su contenido también es mayor en la carne oscura del pollo que en la blanca. Las frutas y las verduras no son una buena fuente de cinc; por tanto, las dietas vegetarianas y las pobres en proteínas animales tienden a ser bajas en este oligoelemento. Se recomienda un consumo de cinc de 12 a 15 mg/día. Los siguientes alimentos aportan dosis altas de cinc: carne de res, carpa, ostiones, leche descremada en polvo, frijol negro, lentejas y ajonjolí.

Vitamina E

Es una vitamina liposoluble y su deficiencia se ha asociado con la alteración de las glucosilasas reparadoras del ADN que eliminan las bases dañadas en el genoma. La vitamina E constituye un potente antioxidante que inhibe la cascada de señalización de NFκB a través de la inactivación de la cinasa IKK, lo que resulta en la retención de NFkB en el citoplasma y bloquea su acción como factor transcripcional. El consumo diario requerido es de 10 mg/día y su fuente dietética principal son las oleaginosas, como las nueces y las almendras.

Interacciones gen-nutrimento

Las condiciones génicas particulares que presentan algunos individuos atribuidas a variaciones génicas, ya sean polimorfismos o mutaciones, influyen en el efecto de los nutrimentos sobre el organismo. Las respuestas a los nutrimentos condicionadas por estas variables constituyen el objeto de estudio de la nutrigenética.

Tanto los polimorfismos como las mutaciones producen cambios estables en la estructura primaria del genoma humano y son responsables de las variaciones fenotípicas que hacen que cada individuo tenga una identidad propia entre el resto de seres humanos detectable por estudios de ADN. Únicamente 0.01% del genoma humano es susceptible de presentar estas variaciones, ya que 99.9% se conserva igual en todos los individuos. Los polimorfismos se presentan en más de 1% de la población; es decir, son cambios que suceden, relativamente, con una alta frecuencia, pueden pasar totalmente inadvertidos, y afectar la tasa de transcripción de un gen, la actividad o la estructura de una proteína. Los cambios nucleotídicos que suceden en un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms,* SNP) son los más frecuentes, aunque también pueden presentarse polimorfismos que afectan a un mayor número de nucleótidos. Se han identificado más de 10 millones de SNP, de los cuales los más comunes aparecen en 5 a 50% de la población. La mayoría de los individuos son heterocigotos (presencia de un alelo silvestre y uno polimórfico) para más de 50 000 SNP, y se ha reportado la asociación de algunos polimorfismos con susceptibilidad o protección a diversos estados patológicos. Por otro lado, las mutaciones son eventos raros que suceden en menos de 1% de la población y, en algunos casos, son responsables directos del desarrollo de enfermedades monogénicas. A continuación, se analizan algunos estados patológicos o no patológicos originados por variaciones en el genoma, que condicionan de manera particular el efecto de algunas sustancias presentes en la alimentación común de los seres humanos.

Fenilcetonuria y fenilalanina

La fenilcetonuria (FCN) es una enfermedad caracterizada por la acumulación de fenilalanina, debido a la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH), que transforma la fenilalanina en tirosina.

La fenilalanina es un aminoácido esencial, es decir que se obtiene a través de los alimentos debido a que nuestro organismo es incapaz de sintetizarlo, que sirve como precursor de varias catecolaminas y hormonas.

La FCN pertenece al grupo de afecciones denominadas *errores innatos del metabolismo*. El consumo de proteínas en la dieta es esencial en la alimentación de cualquier persona; sin embargo, su consumo general puede tener efectos perjudiciales irreversibles en los pacientes que padecen de FCN, en quienes la dieta constituye el elemento principal de su tratamiento. La dificultad para metabolizar fenilalanina origina la acumulación de este aminoácido y la consecuente deficiencia de tirosina. La acumulación de fenilalanina conduce al retraso mental, cuyo grado depende de la mutación sufrida en el gen de la FAH, para el cual se han descrito más de 500 mutaciones que originan cambios de aminoácidos, proteínas truncadas por generación de codones de paro o procesamiento incorrecto del ARNm. Estas mutaciones afectan la actividad de la enzima, lo que hace que la FAH sea parcial o totalmente inactiva. La alteración enzimática se diagnostica desde el nacimiento (figura 29-5).

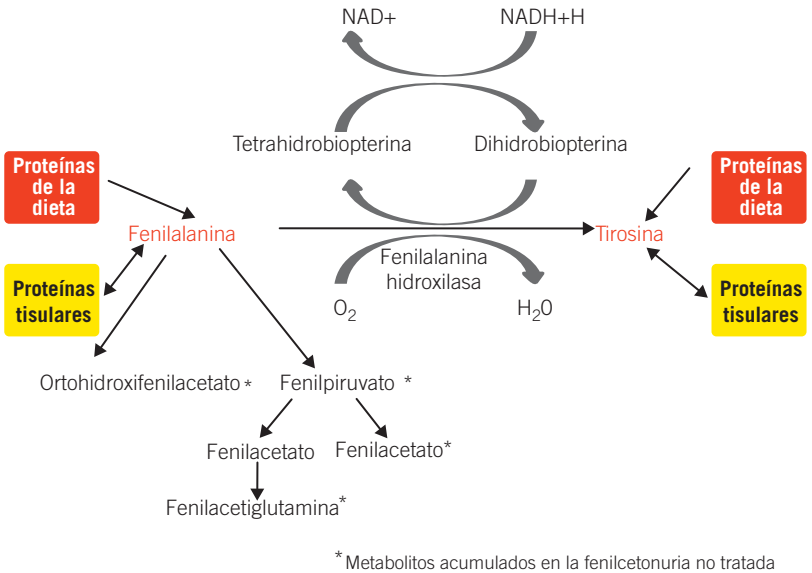


Figura 29-5. Fenilcetonuria. La fenilcetonuria (FCN) es una condición patológica caracterizada por una acumulación de fenilalanina, debido a la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa FHH.

Recomendaciones nutricionales

Los individuos con FCN deben recibir una dieta constituida por un hidrolizado proteico libre de fenilalanina desde el nacimiento y hasta, por lo menos, los primeros seis años de vida, o con la cantidad de fenilalanina tolerada por el paciente para mantener los niveles plasmáticos y tisulares necesarios. Por otro lado, para corregir su deficiencia debe suplementarse la tirosina. De esta manera, se han elaborado dietas específicas para pacientes con FCN que deben seguirse al pie de la letra para lograr el desarrollo normal del paciente. La leche materna contiene en promedio 0.47 mg de fenilalanina/ml. Los alimentos de libre consumo para pacientes con FCN, por no contener fenilalanina son azúcar, miel, aceites y refrescos. Las frutas y las verduras frescas contienen, en promedio, 100 mg de fenilalanina/100 g de alimento. La leche, la mantequilla, el arroz, el maíz, las espinacas, la coliflor y el brócoli contienen entre 100 y 500 mg de fenilalanina/100 g de alimento. La cebada, el queso, la avena, el trigo, las almendras, el huevo, la carne y el pescado contienen un alto contenido de fenilalanina, 500 a 1 000 mg/100 g de alimento. Los alimentos con mayor contenido de fenilalanina, más de 1 000 mg/100 g de alimento, son el frijol, las lentejas, los garbanzos, la soya y, en general, todas las leguminosas. El uso de algunos edulcorantes sintéticos, tales como el aspartamo, está totalmente restringido para los pacientes con FCN, debido a que se producen fenilalanina, ácido aspártico y metanol como productos de su metabolismo. Así, como ya se mencionó antes, los elementos de la dieta para un paciente con FCN deben elegirse cuidadosamente para evitar consecuencias irreparables.

Consumo de etanol y polimorfismos C-1019T de CYP2E1, Arg47His de ADH2, Glu487Lis de ALDH2

El consumo de bebidas alcohólicas es un asunto controversial. Se ha observado el efecto benéfico que ejerce el etanol al incrementar los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL), por lo que algunos autores recomiendan su consumo moderado como parte de una dieta saludable. Sin embargo, el consumo de etanol puede causar daño hepático de manera diferencial en los individuos, debido a diversos polimorfismos asociados a la susceptibilidad a desarrollar una enfermedad hepática alcohólica. Entre ellos, algunos que se presentan en los genes que codifican para las enzimas metabolizadoras del etanol, como el polimorfismo C-1019T del citocromo P450 2E1 (*CYP2E1*2)*, el polimorfismo Arg47His de la alcohol deshidrogenasa 1B *(ADH1B*2)* y el polimorfismo Glu487Lis de la aldehído deshidrogenasa 2 (*ALDH2*2)*. Las enzimas ADH1B y ALDH2 catalizan la oxidación del etanol a acetaldehído y luego a acetato, respectivamente. La enzima *CYP2E1*, por su parte, también convierte el etanol en acetaldehído, lo que genera radicales libres y favorece el estrés oxidativo.

El polimorfismo C-1019T de *CYP2E1* consiste en el cambio de una citosina por una timina en la posición -1019; es decir, en la región promotora del gen. Algunos estudios *in vitro* demuestran que este polimorfismo eleva la tasa de transcripción y la actividad enzimática de *CYP2E1*. El polimorfismo Arg47His de *ADH1B* consiste en el cambio del aminoácido arginina por el aminoácido histidina en la posición 47 de la proteína, y aumenta su actividad enzimática. El polimorfismo Glu48Lis de *ALDH2* se origina por el cambio de glutamina por lisina en el sitio 487 de la proteína, lo cual conduce a la síntesis de una enzima inactiva. En consecuencia, estos polimorfismos conducen a un fenotipo con tendencia a la acumulación de acetaldehído, que puede desencadenar daño hepático. Si bien es cierto que estos polimorfismos se han encontrado principalmente en poblaciones asiáticas, en pacientes mexicanos con cirrosis alcohólica se ha observado asociación entre el daño hepático y el polimorfismo de *CYP2E1*. De este modo, las personas portadoras de este polimorfismo presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar daño hepático en un periodo menor que una persona que no posee dicho polimorfismo. Se han identificado varios polimorfismos asociados al desarrollo de daño hepático, como se muestra en el cuadro 29-1.

Recomendaciones nutricionales

El consumo de bebidas alcohólicas, en particular vino tinto, forma parte de la dieta de poblaciones mediterráneas, en las

Cuadro 29-1. Polimorfismos asociados al desarrollo de daño hepático identificados en individuos que abusan del consumo de bebidas alcohólicas.

Gen	Función	Polimorfismo	Efecto	Daño hepático
IL-1	Proteína proinflamatoria	-511 C/T, -3953 T/C	Aumenta su secreción	Favorece
R-IL-1	Proteína proinflamatoria	VNTR intrón 2	Aumenta su transcripción	Favorece
CYP2E1	Metabolismo del etanol	c1, c2	Aumenta su transcripción	Favorece
TNF	Proteína proinflamatoria	-308 G/A	Aumenta su transcripción	Favorece
CD14	Receptor de LPS	-159 C/T	Transcripción	Favorece
CTL-4	Respuesta inmune	-66 A/G	Aumenta su transcripción	Favorece
MnSOD	Antioxidante	1183 C/T	Disminuye su actividad	Favorece

que se ha asociado con niveles óptimos de cHDL, debido principalmente a su alto contenido de sustancias antioxidantes. Sin embargo, hay que considerar que la dieta mediterránea no sólo considera el consumo de vino tinto, sino también una cantidad equilibrada de los diversos componentes de la dieta. Además, el *estilo de vida mediterráneo* también incluye la realización de actividad física.

Cabe señalar que el consumo de etanol en mujeres no debe rebasar 20 g/día y en hombres 40 g/día, para no caer en los niveles de riesgo de padecer enfermedad hepática alcohólica. La cantidad de alcohol ingerida puede calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$\text{g de alcohol} = \frac{\text{Volumen ingerido} \times \text{grados de alcohol en la bebida}}{100}$$

Lípidos y polimorfismo G-308A de TNFα

Los lípidos forman parte de la dieta recomendada, ya que son componentes estructurales de las membranas celulares del cuerpo. Sin embargo, pueden tener efectos diversos dependiendo de la estructura génica de los individuos. Se han descrito algunos polimorfismos que modifican esta respuesta; entre ellos, uno de los más estudiados es el polimorfismo G-308A de TNFα. TNFα es una citosina proinflamatoria de 233 aminoácidos, cuyo gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) y consta de 1 669 pares de bases distribuidas en cuatro exones y tres intrones. El gen TNFα puede expresarse en tejido adiposo y contribuir a la resistencia a la insulina, además de causar inflamación, estimulación del sistema inmune, disfunción endotelial, estrés oxidativo y calcificación vascular. TNFα presenta un polimorfismo importante en la posición -308, que corresponde a la región promotora, donde se lleva a cabo la sustitución de guanina por adenina. Este polimorfismo incrementa la tasa de transcripción y hace que los individuos que lo presentan sean más susceptibles de desarrollar un perfil inflamatorio; además, se ha propuesto como un polimorfismo de riesgo para enfermedades cardiovasculares y dislipidemias.

Recomendaciones nutricionales

Una dieta balanceada incluye alimentos que contienen fibra soluble e insoluble, de los que existe una gran variedad; entre los de mayor contenido de fibra soluble destacan la avena y los nopales. Se recomienda un consumo de β-glucano de 3 g/día, lo cual equivale aproximadamente a ingerir 25 g de avena o nopales por día. Esta recomendación puede tener resultados muy favorables en la población general, pero principalmente en los individuos con genotipos de susceptibilidad a dislipidemias y riesgo cardiovascular.

Dietas inteligentes

El desarrollo de la nutrición molecular, dado por el conocimiento de la interacción nutrimento-gen/gen-nutrimento, permite elaborar *dietas inteligentes,* que consiste en un plan nutricional diseñado según las necesidades específicas de una población o un individuo. Incluye el cálculo calórico, la proporción adecuada de hidratos de carbono, proteínas y lípidos, suplementos alimenticios y nutrimentos específicos que satisfagan una necesidad particular (figura 29-6). Es necesario redefinir las cantidades de nutrimentos óptimas, ya que las dosis reportadas para alcanzar un efecto modulador de la expresión génica generalmente exceden las cantidades diarias recomendadas (RDA).

Es necesario incrementar lo que se conoce sobre nutrición molecular, ya que no se saben los mecanismos moleculares moduladores para la mayoría de nutrimentos ni las

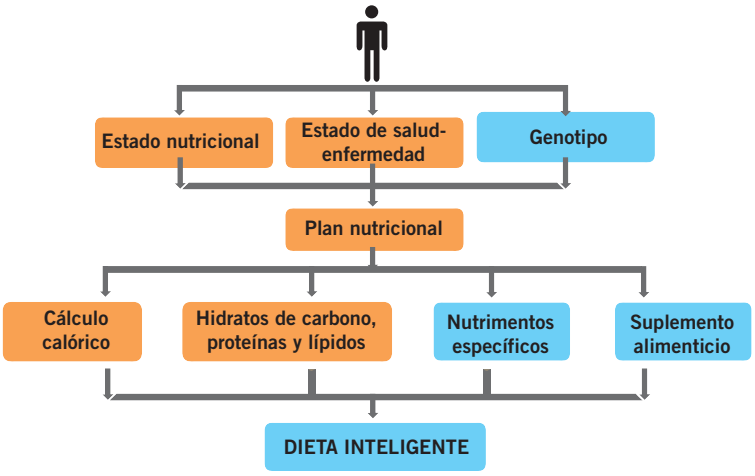


Figura 29-6. Dietas inteligentes. Una dieta inteligente consiste en un plan nutricional diseñado según las necesidades específicas de una población o un individuo. Incluye el cálculo calórico; la proporción adecuada de hidratos de carbono, proteínas y lípidos; suplementos alimenticios, y los nutrimentos específicos que satisfagan una necesidad particular.

Cuadro 29-2. Guía rápida de algunos nutrimentos específicos, útil en la elaboración de "dietas inteligentes".

Nutrimento	Dosis	Alimento	Efecto
EGCG	100 a 300 mg/día	1 taza de té verde (240 ml)	Efecto antineoplásico, inhibición de telomerasa, urocinasa, metaloproteinasa, VEGF e incremento de p53 y p21, antioxidante y antiinflamatorio mediante inhibición de NF*k*B.
DHA	400 mg/kg	Es necesaria la suplementación	Efecto antineoplásico mediante inhibición de c-myc, c-met y β-catenina, promueve apoptosis de células mutadas, antioxidante.
SFN	105 mg/día	1 taza de germinado de brócoli (68 g)	Inhibe desacetilación de p21, induce expresión de bax, apoptótico.
Vitamina E	10 mg/día	25 g de almendras, 3 cucharadas de nuez, 250 g de carne	Antioxidante, inhibe la activación de NF*k*B.
Vitamina C	60 mg/día	½ taza de brócoli, 1 mandarina	Antioxidante, participa en la reparación del ADN.
Carotenoides	24 mg/día	1½ tazas de espinacas cocidas	Antioxidantes, modulan la expresión de genes proinflamatorios.
Ácido fólico	400 mg/día	Requiere suplementación	Participa en la replicación, reparación y mantenimiento de los patrones de metilación del ADN, su deficiencia provoca hipometilación, incorporación de uracilo en lugar de timina en la síntesis del ADN y acortamiento de telómeros.
Cinc	12 a 15 mg/día	1½ tazas de frijoles negros o lentejas	Cofactor enzimático, respuesta inmune.
Vitamina B12	2 mg/día	Requiere suplementación	Participa en síntesis de nucleótidos,ADN, reparación, su deficiencia provoca hipometilación del ADN.

dosis precisas para lograr estos efectos. En el cuadro 29-2 se muestra una guía rápida de algunos nutrimentos específicos que pueden ser útiles en la elaboración de una dieta inteligente.

Conclusiones

Día con día se descubren nuevos polimorfismos de influencia fenotípica, se dilucidan vías de señalización, se comprenden mejor las bases moleculares de las afecciones y la influencia de los nutrimentos en la regulación de la expresión génica. La nutrición molecular hará posible en un futuro próximo, establecer regímenes alimentarios personalizados que constituyan la herramienta principal para conservar, recuperar o mejorar el estado de salud. Asimismo, la nutrición molecular deberá utilizarse como parte de una estrategia de salud pública que contribuya a elevar la calidad de vida de nuestra población.

Ejercicios de integración

1. ¿Qué diferencia hay entre nutrigenómica y nutrigenética?
2. Explique el mecanismo de la modulación de la expresión de genes proinflamatorios ejercido por el nutrimento EGCG.
3. ¿Cuál es la recomendación dietética de carotenoides para prevenir el daño oxidativo al ADN?
4. Desde el punto de vista de la nutrigenética, ¿qué importancia tiene el polimorfismo C-1019T de CYP2E1?
5. ¿Por qué la RDA establecida para un nutrimento no asegura un efecto modulador de la expresión de genes?

Bibliografía

Afman L., Müller M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc*, 2006;106:569-576.

Al-Shali K.Z., House A., Hanley A.J.G., Khan H.M.R., Harris S.B., Zinman B., *et al.* Genetic variation in PPARG encoding peroxisome proliferator-activated receptor γ associated with carotid atherosclerosis. *Stroke*, 2004;35:2036-2040.

Bastidas-Ramírez B.E., Gordillo-Bastidas D., Gordillo-Bastidas E., González-Hita M. *Alimentos funcionales. Nutrición y salud*. Ed. Cuellar, 2009:95-120.

Bays H.E., Tigre A.P., Sadovsky R., Davidson M.H. Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008;6(3):391-409.

Beltz L.A., Bayer D.K., Moss A.L., Simet I.M. Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006;6(5):389-406.

Berletch J.B., Liu C., Love W.K., Andrews L.G., Katiyar S.K., Tollefsbol T.O. Epigenetic and genetic mechanisms contribute to telomerase inhibition by EGCG. J *Cell Biochem*, 2008;103(2):509-519.

Blaschke F., Caglayan E., Hsueh W.A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist: their role as vasoprotective agents in diabetes. *Endocrinol Metanol Clin North* Am, 2006;35:561-574.

García-Bañuelos J., Panduro A., Gordillo-Bastidas D., Gordillo-Bastidas E., Muñoz-Valle J.F., Gurrola-Díaz C.M., *et al*. Genetic polymorphisms of genes coding to alcohol-metabolizing enzymes in Western Mexicans: association of CYP2E1*c2⁄CYP2E1*5B allele with cirrhosis and liver function. *Alcohol Alcoholism Clin Exp Res*, 2012;36(3):425-431.

Gómez Ayala A.E. *Nutrigenómica y nutrigenética, la relación entre la alimentación, la salud y la genómica*, 2007;26(4):78-85.

Gupta S., Hastak K., Afaq F., Ahmad N., Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene*, 2004;23:2507–2522.

Lim K., Han C., Xu L., Isse K., Demetris A.J., Wu T. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 activates beta-catenin in human cholangiocarcinoma cells: evidence for inhibition of these signaling pathways by omega 3 polyunsaturated fatty acids. *Cancer Res*, 2008;15;68(2):553-560.

Marti A.M., Moreno-Aliaga J.M., Zulet A., Martínez J.A. Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. *Nutr Hosp*, 2005;20:157-164.

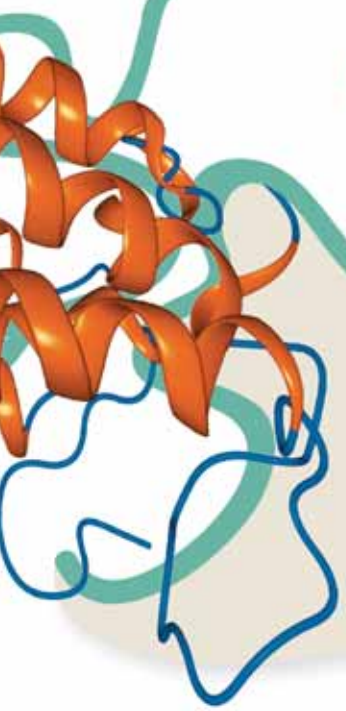
Naasani I., Oh-Hashi F., Oh-Hara T., Feng W.Y., Johnston J., Chan K., *et al. B*locking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 2003;15;63(4):824-830.

Shankar S., Ganapathy S., Hingorani S.R., Srivastava R.K. EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Front Biosci*, 2008;1(13):440-452.

Shulman A.I., Mangelsdorf D.J., Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med*, 2005;353(6):604–615.

US Preventive Services Task Force. Screening for phenylketonuria (PKU): US Preventive Services Task Force Reaffirmation recommendation. *Ann Fam Med*, 2008;6(2):166.

Valve R., Sivenius K., Miettinen R., Pihlajamäki J., Rissanen A., Deeb S.S., *et al.* Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-γ gene are associated with severe overweight among obese women. J *Clin Endocrinol Metab*, 1999;84(10):3708-3712.



Capítulo 30

Biología molecular del deporte

Óscar Gabriel Béjar Mejía / Ana Soledad Sandoval Rodríguez
Pablo Manuel Saucedo Galindo / Samantha Rivero-Borrel Sandoval

Introducción

Se considera que la actividad física es todo tipo de movimiento corporal que realiza el ser humano durante un determinado periodo, ya sea como parte de su actividad laboral o en sus momentos de ocio; este movimiento aumenta considerablemente el consumo de energía y los niveles del metabolismo de reposo, es decir, la actividad física induce el consumo de calorías.

La actividad física diaria conlleva beneficios para la salud, cardiovasculares, musculoesqueléticos, inmunológicos, etc., y las actividades físicas integradas a la vida cotidiana, como caminar, transportarse en bicicleta, subir escaleras, realizar las labores del hogar o simplemente hacer las compras, son benéficas, sobre todo si se realizan con frecuencia. Sin embargo, lo más recomendable es practicar ejercicio físico programado o deporte a intensidad moderada. Por **deporte** se entiende cualquier forma de actividad física, organizada o no, cuyo objetivo es expresar o mejorar las actitudes fisicopsíquicas, desarrollar las relaciones sociales o alcanzar resultados deportivos en cualquier nivel. Para la realización correcta de un deporte se requiere de entrenamiento. El **entrenamiento** es la planificación y realización sistemática de las medidas necesarias (contenidos y métodos) para la obtención de ciertos efectos físicos o psicológicos, persistentes y duraderos, a través de la actividad física. El ejercicio requiere movimientos corporales, lo cual se consigue a través de los movimientos de los músculos esqueléticos. La célula muscular sólo es capaz de obtener energía química del adenosín trifosfato (ATP), y por tanto los macronutrientes deben ceder la energía de sus enlaces químicos a través de distintos procesos bioquímicos. Para que esto suceda, se dispone de distintas vías metabólicas que proporcionan energía.

Vías energéticas durante la actividad física

La principal energía para la contracción de las fibras musculares se obtiene de la desintegración del ATP en adenosín difostato (ADP) y adenosín monofostato (AMP). Esta reacción se desarrolla por medio de la enzima ATPasa de miosina o adenosintrifosfatasa de miosina; sin embargo, la cantidad de ATP disponible en el músculo sólo alcanza a proporcionar energía por 1 a 2 segundos. Si las contracciones musculares se prolongan por más tiempo, el ATP tiene que ser abastecido a través de fuentes energéticas secundarias, que se dividen en **vía energética anaeróbica** y **vía energética aeróbica**. Los esfuerzos anaeróbicos tienen una duración máxima de dos minutos, mientras que los esfuerzos de resistencia duran más de 10 minutos y su fuente energética proviene en 80% de vías oxidativas, por lo que se le denomina vía aeróbica, y su principal fuente de energía son los hidratos de carbono.

Vía anaeróbica aláctica: fosfocreatina

El primer mecanismo de las vías energéticas secundarias es el desdoblamiento de la molécula creatinfosfato (CrP) en creatina:

$$\text{ATP} + \text{CrP} \rightarrow \text{ATP} + \text{Cr}$$

En el músculo, el CrP se reserva en pequeñas cantidades. En personas no entrenadas la energía proveniente de esta vía metabólica dura hasta seis segundos y en atletas de alto rendimiento, de 12 a 20 segundos. Los ejercicios que usan esta vía energética no producen lactato, por lo que también se les denomina *anaeróbicos-alácticos*. Esta vía se activa en una salida de un portero de su área chica, durante carreras de atletismo de 100 m planos, en una salida en natación, durante el salto de longitud y triple salto, o en lanzamientos de bala, jabalina, disco, etcétera.

Vía anaeróbica láctica: glucólisis anaerobia

Si la demanda energética es mayor de seis a 20 segundos, el CrP se agota; a partir de ese punto, la energía se obtiene del

glucógeno muscular, a través de la glucólisis anaerobia. Durante esta vía metabólica se despliega la energía de la molécula de glucosa y como metabolito se generan dos moléculas de piruvato. A continuación, en la glucólisis aerobia, el piruvato puede transformarse en acetil coenzima A (CoA) por descarboxilación oxidativa, a través de una serie de reacciones catalizadas por la piruvato deshidrogenasa, localizada en la matriz mitocondrial. La acetil-CoA puede entrar al ciclo de Krebs para generar más energía. Sin embargo, cuando la demanda de energía sobrepasa la disponibilidad de oxígeno en sangre, la piruvato deshidrogenasa no alcanza a convertir el piruvato en acetil-CoA lo suficientemente rápido, por lo que comienza a acumularse, lo que inhibe la glucólisis y reduce la producción de ATP. En estas condiciones, la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) reduce el piruvato a lactato mediante la siguiente reacción:

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{lactato} + \text{NAD}^+$$

La producción de lactato tiene como función oxidar el NADH + H para regenerar el dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD^+), necesario para la glucólisis y para que continúe la producción de ATP. En la degradación anaeróbica del glucógeno se origina lactato en concentraciones que oscilan de 4 a 20 mmol/L de sangre; acumulaciones mayores a 6 a 8 mmol/L impiden un desempeño deportivo eficiente. La glucólisis anaeróbica alcanza su máximo nivel después de unos 45 segundos y se mantiene unos dos minutos; por tanto, la duración de los esfuerzos anaeróbicos lácticos está limitada por la acidificación del músculo (por el agotamiento de los sistemas amortiguadores del músculo que tratan de aminorar la concentración de cationes hidrógeno liberados en la hidrólisis de ATP) y no por el agotamiento del glucógeno muscular. Estos esfuerzos pueden apreciarse en la carrera de 400 m planos y las pruebas de 100 m en natación.

Por otro lado, el lactato producido sale de la célula muscular y llega al hígado por el torrente sanguíneo, donde se vuelve a transformar en glucosa por el proceso de gluconeogénesis, lo que se conoce como *ciclo de Cori*.

Vía aeróbica

Esta vía puede dividirse en dos: ejercicios físicos de larga duración, y ejercicios físicos de corta y mediana duración.

En los ejercicios físicos de larga duración la energía proviene principalmente de los lípidos. Aquí la velocidad de la producción de energía es baja, y como la grasa es una reserva de energía abundante permite mantener esfuerzos físicos por periodos largos, como en el caso de maratones, triatlones, marchas y carreras de bicicleta.

En cambio, la energía necesaria para ejercicios aeróbicos de corta o mediana duración se obtiene principalmente de los hidratos de carbono, cuya combustión es más rápida que la de las grasas; en determinado momento las reservas de hidratos de carbono se agotan. En este tipo de ejercicios pueden aparecer concentraciones de lactato en cantidades de 2 a 4 mmol/L sangre. Esta vía de obtener energía se emplea en pruebas de 400 m en natación y carreras de atletismo de 500 y 1 000 m.

Vía aeróbica: glucólisis aeróbica

A partir de los dos minutos, aproximadamente, la energía se obtiene en principio por la oxidación aeróbica del resto de las reservas de glucógeno; la acetil–CoA se convierte, junto con el ácido oxálico (oxalacetato), en ácido cítrico, que en cada ciclo de Krebs generará una molécula de oxaloacetato, dos CO_2, guanosín trifosfato (GTP) y electrones de alto potencial en las moléculas de NADH y FADH2. El balance neto del ciclo es:

$$\text{Acetil–CoA} + 3\ \text{NAD}^+ + \text{FAD} + \text{GDP} + \text{Pi} + 2\ \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CoA–SH} + 3\ (\text{NADH} + \text{H}^+) + \text{FADH}_2 + \text{GTP} + 2\ \text{CO}_2$$

Este proceso se relaciona con un aprovechamiento óptimo de la energía, ya que mediante la reducción completa de 1 mol de glucosa se recuperan 38 moléculas de ATP. Esta fuente energética suele durar unos 30 minutos en personas no entrenadas y de 60 a 90 minutos en personas entrenadas. Después de este periodo, por lo general las reservas de glucógeno muscular y hepático quedan agotadas.

Vía aeróbica: lipólisis aeróbica

La energía necesaria para mantener los niveles de ATP en el músculo durante un periodo de actividad constante puede obtenerse de hidratos de carbono exógenos provenientes de los alimentos, como es usual en carreras de ciclismo en ruta, triatlón, maratón, etc. Si, por algún motivo, durante un ejercicio de alta intensidad no puede llevarse a cabo este abastecimiento, la energía necesaria se proveerá por la vía de la glucogenólisis hepática o por oxidación de los aminoácidos. Así, si el esfuerzo continúa, aunque comience a bajar de intensidad, la energía se obtendrá de la oxidación aeróbica de los triglicéridos, convirtiéndolos en glicerina y ácidos grasos libres. La lipólisis aeróbica de 1 mol de triglicéridos produce una recuperación energética de 130 moles de ATP; sin embargo, en este proceso la velocidad de obtención de energía es lenta.

En la figura 30-1 se resumen las vías energéticas activadas durante el ejercicio.

Tipos de fibras musculares y su influencia en el rendimiento deportivo

El rendimiento deportivo se divide en lento frente a rápido, y resistencia frente a potencia, y depende en gran medida de las funciones cardiorrespiratorias ($VO_{2máx}$; volumen/minuto, tamaño del corazón y cantidad de hemoglobina), así como de la hipertrofia y los tipos de fibra muscular del músculo esquelético. Se conocen tres tipos de fibras

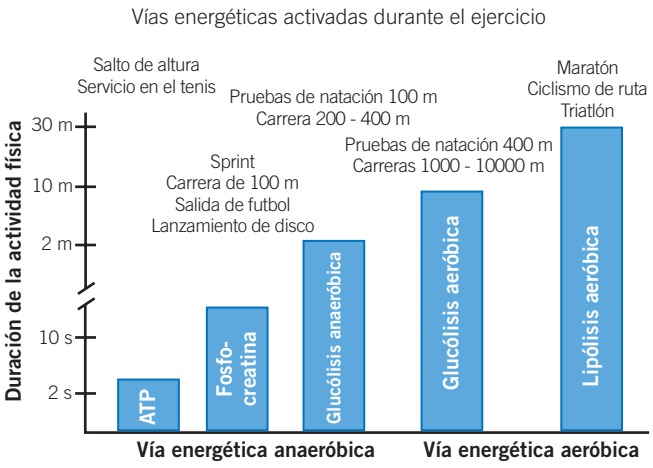


Figura 30-1. Vías energéticas activadas durante el ejercicio. La actividad física se genera por la contracción de las fibras musculares que obtienen energía de la molécula de ATP. La cantidad de ATP disponible en el músculo es reducida, por lo que debe ser producido por fuentes energéticas como la vía anaeróbica y la vía aeróbica. Los esfuerzos anaeróbicos tienen una duración máxima de 2 minutos (salto de altura, lanzamiento de disco, pruebas de 100 m) y emplean la vía anaeróbica para la obtención de ATP. Esfuerzos de resistencia como los implicados en pruebas de 400 m o actividades de 10 minutos o más obtienen 80% de su fuente energética de vías oxidativas o vía aeróbica, siendo su principal fuente de energía los hidratos de carbono.

musculares esqueléticas: rojas (tipo I), blancas (tipo II) e intermedias. La diferencia funcional de las fibras depende del comportamiento de la ATPasa de miocina, ya que las de tipo I emplean la vía oxidativa, mientras que las de tipo II, la vía glucolítica anaerobia. Las ***fibras de tipo I,*** o ***de contracción lenta***, abundan en los músculos *rojos*, su diámetro es pequeño y contienen una gran cantidad de mioglobina, así como numerosas mitocondrias localizadas entre las miofibrillas y en acumulaciones por debajo del sarcolema (figura 30-2a). Este tipo de fibras son poco fatigables. Las ***fibras de tipo II,*** o ***de contracción rápida***, están presentes en los músculos *blancos*, su diámetro es mayor, poseen menor cantidad de mioglobina y menor número de mitocondrias entre las miofibrillas, en la banda I. En este tipo de fibras la línea Z es mas delgada que en las fibras rojas (figura 30-2b). Las ***fibras intermedias*** presentan características medias entre los otros tipos de fibras, pero histológicamente se asemejan más a las fibras de contracción lenta y son más abundantes en los músculos rojos. Poseen un número de mitocondrias equivalente al de las fibras rojas, pero su línea Z es delgada, como la de las fibras blancas (figura 30-2c). Una diferencia notable entre las fibras es la cantidad de glucógeno almacenado, más abundante en las fibras de tipo II. Según el músculo de que se trate predominará cierto tipo de fibras musculares (p. ej., en los músculos extensores del codo predominan fibras tipo II, mientras que en el sóleo predominan las fibras de tipo I).

Cambios fisiológicos propiciados por el ejercicio constante

Con independencia de la disciplina deportiva practicada, el ejercicio constante induce cambios corporales, como un metabolismo energético más rápido (en el ejercicio, la tasa de fosforilación oxidativa en el músculo esquelético se incrementa hasta 100 veces), una masa ósea más sólida y resistente, aumento del tamaño de las mitocondrias en las células musculares, hipertrofia cardiaca y presión sanguínea regularmente estable. Por otro lado, el ritmo cardiaco en reposo de un atleta de alto rendimiento oscila entre los 30 y los 40 lat/min; en cambio, en una persona no entrenada el ritmo cardiaco es de 60 a 90 lat/min. En el pulmón, la cantidad de aire espirado por minuto aumenta como consecuencia de la disminución del contenido de oxígeno en la sangre y el aumento tanto en la producción de dióxido de carbono (CO_2) como en los ácidos del cuerpo (H^+). Estas variables activan potenciales de acción que se envían al centro respiratorio localizado en el bulbo raquídeo y la protuberancia cerebral, para que se aumente la profundidad y la frecuencia de la ventilación pulmonar y así incrementar la eliminación de estos dos compuestos. El incremento de la capacidad de oxigenación deriva en un agrandamiento de los pulmones. Según la disciplina deportiva que se practique puede aumentarse el tono muscular, inducir mayor resistencia a la acumulación de lactato en sangre y acelerar la degradación muscular del lactato, generando resistencia a la fatiga muscular. Los cambios locales en los músculos, como la cantidad de lactato producido y aumento de la temperatura muscular y de la concentración de CO_2 debido a un mayor metabolismo, facilitan la descarga de oxígeno desde las moléculas de hemoglobina, por lo que también puede incrementarse la cantidad de glóbulos rojos en la sangre o la cantidad de plasma sanguíneo, lo que reduce la viscosidad sanguínea. La movilización de las diferentes reservas energéticas, para satisfacer la demanda de los músculos cardiaco y esquelético durante el ejercicio, varía según el tipo, la duración y la intensidad del ejercicio realizado, así como la intensidad y la condición física del individuo. En la figura 30-3 se aprecian los cambios corporales que se inducen durante el ejercicio.

Cambios en la expresión génica durante el ejercicio

El ejercicio induce cambios en la expresión génica en diferentes órganos y sistemas, como el músculo, la vasculatura y las vías energéticas. Las diferentes fases del ejercicio y la etapa de recuperación posejercicio también conllevan cambios transcripcionales que tienden a hacer más eficientes las condiciones metabólicas. Algunos de los cambios en la expresión génica durante la actividad física se resumen en el cuadro 30-1. A continuación, éstos se agrupan según su participación metabólica.

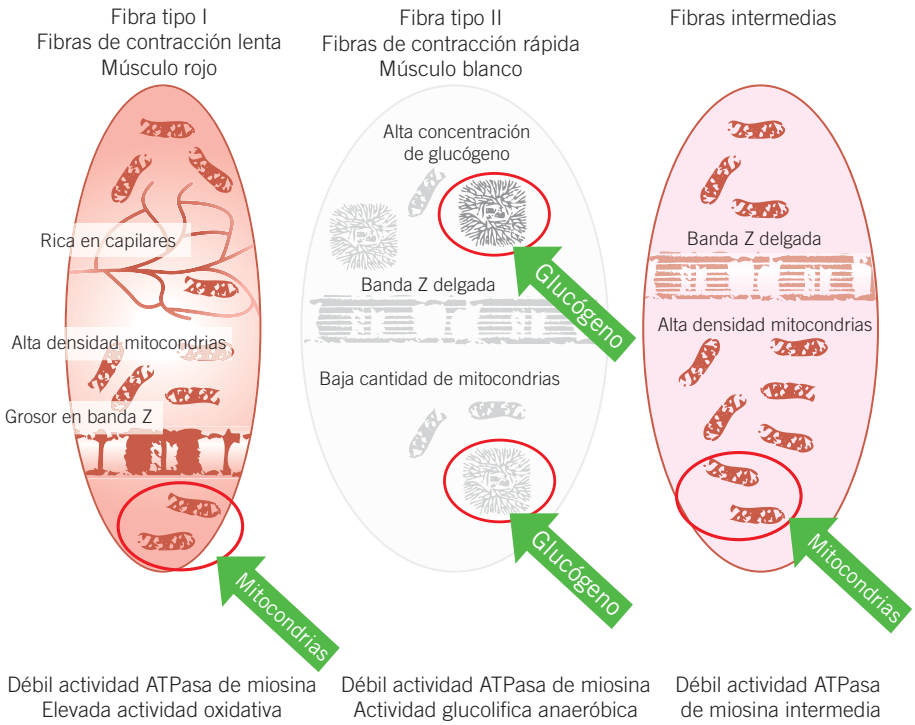


Figura 30-2. Tipos de fibras musculares. El músculo esquelético está formado por la combinación de tres tipos de fibras denominadas rojas, blancas e intermedias, que se diferencian por la vía metabólica predominante para la obtención de energía. **A)** Las fibras tipo I o de contracción lenta abundan en los músculos rojos y contienen gran cantidad de mioglobina y numerosas mitocondrias. Las fibras de este tipo son poco fatigables. **B)** Las fibras tipo II o de contracción rápida, presentes en los músculos blancos, poseen menor cantidad de mioglobina y un número menor de mitocondrias. Contienen gran cantidad de glucógeno almacenado, en comparación con los otros tipos de fibras musculares. **C)** Las fibras intermedias presentan características medias entre los otros tipos de fibras, pero histológicamente se asemejan más a las de contracción lenta y son más abundantes en los músculos rojos. Poseen un número de mitocondrias equivalente al de las fibras rojas.

Genes que regulan el tamaño muscular

Los mecanismos moleculares por los cuales un aumento en la carga que soporta un músculo incrementa la masa muscular implican diversos genes que regulan el crecimiento del músculo. Entre ellos se encuentra el de la α-actina del músculo esquelético. La sobrecarga muscular conlleva hipertrofia del músculo, por aumento de la síntesis de esta proteína miofibrilar, ya que el promotor de la α-actina de músculo esquelético contiene el elemento de respuesta a suero 1 (*serum response element*, SRE1), un elemento regulador de hipertrofia que activa genes de proteínas contráctiles en respuesta a una sobrecarga muscular. El factor de respuesta al suero (*serum response factor*, SRF) es un factor de transcripción que aumenta en músculos hipertróficos y homodimeriza con el SRE, con lo que potencia la transcripción del ARNm de la α-actina. Parece que este mecanismo es el responsable de la hipertrofia en la fase tardía de los cambios adaptativos inducidos por el ejercicio. En la fase temprana de los cambios adaptativos inducidos por sobrecarga muscular, parecen estar implicados otros genes, cuya traducción se activa con la fosforilación de la enzima p70S6K. Esta vía de señalización se activa solamente con ejercicio de carga muscular; no así con ejercicios aeróbicos. Así también, la flexión muscular con carga incrementa la transcripción de las isoformas hepática y muscular de factor de crecimiento similar a la insulina I (*insulin-like growth factor I*, IGF-I) lo que induce hipertrofia muscular. La concentración extracelular de IGF-I regula la activación de la enzima fosfatidilinositol-3'-cinasa (PI3-K), que a su vez regula mediadores intracelulares como el AKT/PKB, los cuales, con su actividad cinasa, activan genes implicados en los cambios fenotípicos atribuidos al ejercicio de carga muscular. Por otro lado, se cree que el aumento de las concentraciones de calcio e IGF-I en los músculos con carga aumenta la calcineurina. La señalización de la vía de la calcineurina aumenta la masa muscular, ya que esta fosfatasa dependiente de Ca^{2+}-calmodulina señaliza corriente abajo y desfosforila al factor nuclear de células T activadas (*nuclear factor of activated T cells*, NFAT); además, varias isoformas de este factor transcripcional activan genes implicados en la hipertrofia de fibras musculares de contracción lenta. La miostatina también es uno de los genes modificados duran-

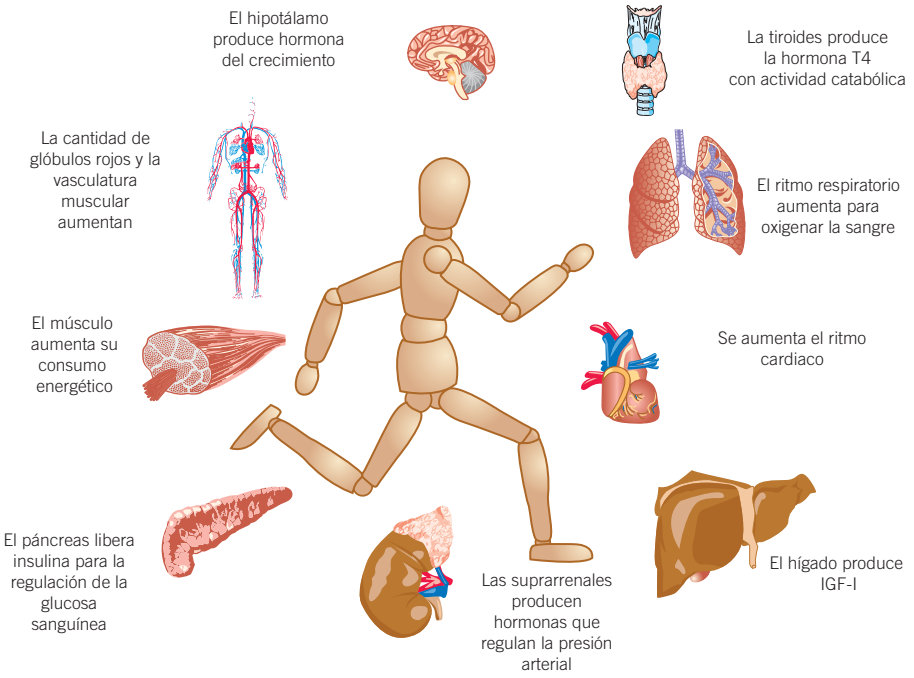


Figura 30-3. Cambios fisiológicos de adaptación al ejercicio. Independientemente de la disciplina deportiva realizada, el ejercicio constante induce cambios corporales, como un metabolismo energético más rápido, masa ósea más sólida, aumento de tamaño de las mitocondrias en las células musculares, hipertrofia cardiaca, liberación de hormona del crecimiento por el hipotálamo, ritmo cardiaco menor, expansión del volumen pulmonar, aumento del tono muscular, mayor resistencia a la fatiga muscular.

te el ejercicio muscular con cargas. Esta proteína, conocida también como factor 8 de crecimiento y diferenciación, limita el crecimiento muscular, y al parecer retrasa el desarrollo de las células madre musculares. Durante el ejercicio con carga se inhibe la producción de esta proteína, pero el efecto se revierte con la ausencia de carga.

Genes de la energética en músculo

La duración y la frecuencia de la contracción muscular aumentan la cantidad de mitocondrias en el músculo. En este sentido, el citocromo C es un marcador de la densidad mitocondrial en el músculo y, por tanto, de su capacidad oxidativa. Durante el ejercicio, los niveles de ARNm, cito-

Cuadro 30-1. Genes que cambian su expresión durante la actividad física. El ejercicio induce cambios en la expresión génica en diferentes órganos y sistemas como el músculo, el sistema circulatorio y las vías energéticas. Las diferentes fases del ejercicio y la etapa de recuperación también conllevan cambios transcripcionales que tienden a hacer más eficientes las condiciones metabólicas.

Gen	Se induce por	Efectos sobre la actividad física
IGF-1	Ejercicio con carga muscular. Se sintetiza en hígado y músculo.	Activación de células satélite musculares, hipertrofia y fuerza muscular.
AMPK	Niveles sanguíneos de ATP bajos y de AMP elevados.	Fosforila proteínas y provoca la inhibición de vías anabólicas, como la biosíntesis de macromoléculas, crecimiento y proliferación celular, mientras enciende las vías que producen ATP, como la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos.
GLUT-4	El ejercicio con carga aumenta la transcripción genética del Glut-4 dependiente de la concentración de energía intracelular y la concentración de calcio.	Se expresa en tejido adiposo y en músculo; internaliza la glucosa sanguínea a la célula para que sea utilizada como fuente de energía.
eNOS	El ejercicio agudo aumenta el flujo sanguíneo; las células endoteliales se estimulan.	El óxido nítrico aumenta el flujo sanguíneo a través de la vasodilatación.
Calcineurina	Los niveles elevados de Ca_{2+} en músculo, por la actividad física.	Mejora la función cardiaca, induce hipertrofia ventricular.

cromo C y su proteína se incrementan, y en los periodos de inactividad disminuyen. La actividad de la adenosín monofosfato (AMP) cinasa (AMPK) también aumenta de dos a tres veces durante el ejercicio, y es la responsable de inducir algunas de las adaptaciones al ejercicio de resistencia, como el incremento en GLUT-4, hexocinasa, proteína desacoplante 3 y varias enzimas implicadas en la oxidación mitocondrial en el músculo. En el sarcoplasma, aumentos en las concentraciones de Ca^{2+}, como los que se obtienen durante el ejercicio, se asocian con incrementos en la actividad de la cinasa dependiente de Ca^{2+}-calmodulina, la cual aumenta la expresión de PGC-1 y citocromo C. En la fase de recuperación posejercicio, genes implicados en el metabolismo aumentan su transcripción en el músculo esquelético, como la proteína desacoplante 3, la cinasa 4 de piruvato deshidrogenasa, la hemooxigenasa-1, lipoproteína lipasa y la carnitina pamitoiltransferasa I.

Genes cardiovasculares

Durante la actividad física, el ritmo cardiaco y el flujo sanguíneo aumentan, por lo que se requiere la dilatación vascular. Para ello, el endometrio funciona como modulador del tono vascular sintetizando y liberando óxido nítrico, lo que promueve una vasodilatación. El incremento en óxido nítrico mediado por el ejercicio se debe principalmente a una sobrerregulación génica y proteica de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Otro mecanismo molecular propuesto es que el óxido nítrico sintetizado en el entrenamiento con ejercicios aeróbicos incrementa los niveles del ARNm de superóxido dismutasa endotelial (eSOD) en las células de músculo liso adyacentes, con lo que se previene la degradación del óxido nítrico mediada por los radicales $O_2^{\bullet}$ y se prolonga su vida media. Asimismo, el ejercicio constante induce hipertrofia cardiaca, cuyo efecto es el aumento en la reserva cardiaca (volumen de sangre bombeado por los ventrículos por unidad de tiempo) y la contractilidad. El corazón de un atleta tiene el doble de reserva cardiaca que un corazón adulto clínicamente sano. La hipertrofia cardiaca presenta la ventaja fisiológica de que se incrementa la función cardiaca con un menor consumo de oxígeno, con lo que disminuye el ritmo cardiaco submáximo y en reposo y aumentan el retorno venoso y el flujo cardiaco máximo. Este crecimiento ventricular inducido por el ejercicio aeróbico regular lleva el flujo sanguíneo de 75 ml/lat a 105 ml/lat, por lo que es posible bombear hasta 30 L/min durante la actividad física. La calcineurina es, en parte, responsable de esta hipertrofia inducida por el ejercicio; en atletas se reporta una actividad de esta fosfatasa en el miocardio hasta 250% mayor que en sujetos sedentarios. De manera similar a su efecto en el músculo estriado, el IGF-I y la norepinefrina podrían tener injerencia en la hipertrofia cardiaca. En jugadores profesionales de fútbol *soccer* se han reportado niveles sanguíneos mayores de IGF-I en las venas coronarias comparados con sujetos sedentarios.

Genes del metabolismo

La AMPK es un sensor de los niveles de ATP; niveles energéticos bajos estimulan su activación, con lo que las vías de señalización se regulan positivamente, y se restablecerán las reservas de ATP. La AMPK aumenta en músculos con fibras rápidas en respuesta a la contracción con carga; los efectos corriente abajo de esta enzima incluyen la estimulación de la expresión génica de los GLUT4 y la hexocinasa de moléculas que estimulan la oxidación de ácidos grasos y glucólisis, como la PFK2. También regula de forma negativa las moléculas centrales de procesos en que se consume ATP, como TORC2, glucógeno sintetasa, SREBP-1 y TSC2, lo que promueve la inhibición de la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas.

Genes antioxidantes

En la fase aguda del ejercicio el estrés oxidativo vascular se incrementa, con lo que se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La exposición de las células del músculo esquelético a los ROS estimula la captación de glucosa mediante un mecanismo dependiente de fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K). El O_2^- producido es el mediador principal en la transmisión de la señal activadora de la subunidad 1 alfa del factor inducido por hipoxia 1 alfa (HIF-1a) en células endoteliales. Este factor entra al núcleo celular, en donde, unido al factor inducido por hipoxia 1 beta (HIF-1b), actúa como factor de transcripción de genes con elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en su promotor, entre los que se encuentran los que codifican para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la eritropoyetina (Epo), el transportador 1 de glucosa (GLUT1), la subunidad beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFb), el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-I) y la subunidad alfa del factor de crecimiento tumoral (TGF-alfa). Estos genes abarcan enzimas respiratorias y transportadoras hasta hormonas involucradas en la regulación de la circulación y la eritropoyesis, necesarias para la adaptación durante el ejercicio.

Determinantes génicos que favorecen la actividad física

La información genética de los deportistas es un factor determinante para el éxito de éste en determinada disciplina deportiva. Se ha comprobado la influencia de los factores genéticos en el desempeño de ciertos deportes, por lo que desde el momento de su concepción cada persona está predispuesta a ciertas cualidades individuales o carencias fisiológicas o metabólicas que pueden ser favorables o desfavorables en la realización de determinada actividad física.

Estas predisposiciones genéticas en favor de una actividad física son la estatura, la capacidad de oxigenación sanguínea, el tipo de fibra muscular predominante, la red

sanguínea coronaria y pulmonar, el tamaño del corazón, el volumen del ventrículo izquierdo, etc. Sin embargo, otras determinantes importantes son la tradición deportiva de la familia, la motivación, el factor nutricional y geográfico al que el atleta ha sido expuesto, las cuales se cree que influyen hasta en 70% en el rendimiento deportivo. El análisis genético puede considerarse decisivo sólo para ciertos genes cuya influencia en el desempeño deportivo es crucial.

$VO_{2\ máx}$ y genética

El acondicionamiento físico se mide por la cantidad máxima de oxígeno que un organismo puede transportar en un minuto y se define por el consumo máximo de oxígeno ($VO_{2\ máx}$), que se mide en litros por minuto, se correlaciona con el peso del individuo e indica la capacidad aeróbica de una persona. El $VO_{2\ máx}$ mejora con casi todos los tipos de entrenamientos, pero depende de varios factores fisiológicos, como la capacidad de ventilación pulmonar, la capacidad difusora de los pulmones, el tamaño del corazón, la capacidad de la sangre para transportar el oxígeno, la utilización muscular del oxígeno y el tipo de fibras musculares. El $VO_{2\ máx}$ es una capacidad condicionada por la genética; diversos estudios han demostrado que existen personas *respondedoras* al entrenamiento que logran que su $VO_{2\ máx}$ aumente en 60%, mientras que otros individuos, clasificados como *no respondedores*, sometidos al mismo entrenamiento no mejoran notablemente su capacidad aeróbica.

Gen *ACTN3*

El tipo de fibra muscular es una característica fenotípica que influye de manera determinante en el desempeño deportivo. La contracción muscular está determinada por la interacción de las proteínas miofibrilares miosina y actina. Las proteínas α-actinas son una familia de proteínas de unión a actina importantes para la contracción y el anclaje de los filamentos musculares de la actina. En seres humanos, cuatro genes codifican para estas proteínas: ACTN1, 2, 3 y 4. ACTN2 y 3 son las que se expresan en el citoesqueleto del músculo esquelético. Ambas proteínas se localizan en la línea Z de la fibra muscular, pero ACTN2 se expresa en todas las fibras musculares, mientras que ACTN3 restringe su expresión a las fibras de tipo II o de contracción rápida. El gen *ACTN3* produce la proteína alfa-actina-3, que permite una contracción más eficaz de los músculos, característica imprescindible para la excelencia en deportes donde son necesarias la fuerza y la rapidez de contracción muscular. En este gen, el cambio polimórfico de un nucleótido C → T en la posición 1747 del exón 16 provoca una mutación sin sentido donde una arginina R es remplazada por un codón de paro (X) prematuro (R577X), lo que ocasiona una pérdida de la función de dicha proteína. En los portadores homocigotos para el polimorfismo 577XX, la pérdida de la proteína ACTN3 implicaría desventajas notables en la contracción de las fibras musculares, especialmente las de tipo II, por lo que el gen ACTN2 se sobreexpresa para tratar de compensar la pérdida de la proteína ACTN3. Por tanto, atletas con la variación atlélica 577RR o 577RX cuentan con una ventaja genética asociada a mejor desempeño de actividades físicas que requieran explosión y fuerza muscular, comparados con individuos con genotipos 577XX. Las investigaciones han mostrado asociación del genotipo 577XX con una fuerza máxima y una potencia absoluta mayor con respecto a los otros genotipos en mujeres, efecto que no se presenta en los varones. En atletas de élite italianos la presencia de este genotipo se asoció a una mayor masa muscular, mientras en población general en Grecia se encontró con mayor frecuencia en personas con habilidades de *sprinter*. En otros estudios, en que se compararon las frecuencias genotípicas en atletas de élite en pruebas de velocidad o resistencia y población abierta clínicamente sana, se encontró menor frecuencia del genotipo XX en los atletas (6%) que en la población general (18%).

Gen AMPD1

El gen AMPD1, localizado en el cromosoma 1, sitio p13-p21, codifica para la isoforma M de la AMP deaminasa, también denominada *mioadenilato deaminasa*. Esta isoforma constituye 95% de la AMPD total y está expresada principalmente en las fibras musculares de tipo II. Durante las contracciones musculares intensas y cortas, la demanda de ATP excede la capacidad de resíntesis y genera una depleción de 40% de sus niveles en la célula muscular. Como consecuencia de ello, el ADP se incrementa, lo que caracteriza la fatiga muscular y se traduce en inhibición del proceso contráctil. Para tratar de minimizar la acumulación de ADP y producir ATP, el intenso trabajo metabólico del músculo esquelético activa la reacción catalizada por la AMP deaminasa: AMP ⇔ IMP + NH3. La AMP deaminasa cataliza la conversión del AMP en IMP (inosina monofosfato) y libera una molécula de amonio (NH_3). Esta reacción minimiza indirectamente la acumulación de ADP al metabolizar el AMP y favorecer el balance de la reacción catalizada por la adenilato cinasa hacia la producción de ATP y AMP: 2 ADP ⇔ ATP + AMP.

La transición del nucleótido 34 del gen de la AMPD1, de una C por T (polimorfismo C34T), ocasiona una mutación sin sentido que convierte el codón CAA, que codifica para glutamina en codón de paro TAA, con lo que se genera una proteína truncada. Por tanto, los genotipos TT o CT presentan niveles disminuidos (hasta 1% para los homocigotos TT) de la actividad de la mioadenilato deaminasa, comparados con individuos homocigotos al alelo CC. Esto se traduce en una capacidad reducida para el ejercicio, ya que durante su práctica se producen calambres musculares, dolor y fatiga muscular debido a la acumulación excesiva de ADP y AMP. En personas caucásicas la prevalencia del genotipo TT es de 2%, de 20% para los heterocigotos. Al asociarse el polimorfismo C34T de AMPD1 con funciones respiratorias en individuos sedentarios sometidos a un

entrenamiento de 20 semanas, los valores de $VO_{2\ máx}$ y $VCO_{2\ máx}$ fueron menores en individuos con el genotipo TT, lo que demuestra una adaptación ventilatoria menor en respuesta al entrenamiento.

Gen de la enzima conversiva de angiotensina

El sistema renina-angiotensina desempeña un papel importante en la homeostasis del sistema circulatorio. Producida por las células yuxtaglomerulares renales, la renina hidroliza el angiotensinógeno y genera angiotensina I, que se convertirá en angiotensina II por acción de la enzima conversiva de angiotensina (ECA). La angiotensina II es un potente vasoconstrictor que provoca un incremento de la presión sanguínea. El sistema renina-angiotensina también se expresa en células musculares y cardiacas; además, la ECA hidroliza y, por tanto, inactiva a la bradicinina, que es un vasodilatador. El gen de la ECA se localiza en el cromosoma 17, sitio q23, y en su intrón 16 existe una variante génica de inserción (I) o deleción (D) de 287 pb. El alelo D se asocia a mayores niveles circulatorios de ECA y, por tanto, a incrementos en la presión y flujo sanguíneo. Algunos estudios han demostrado mayor frecuencia del alelo I en atletas que practican deportes de resistencia, así como mayor frecuencia del alelo D en los que se dedican a deportes que requieren fuerza explosiva muscular. La hipertrofia cardiaca del ventrículo izquierdo, característica de los atletas de élite, se asocia con los fenotipos DD y DI. Un total de 70.4% de los atletas con fenotipo DD, 42% de los individuos con fenotipo DI y 0% de aquéllos con genotipo II alcanzan los criterios de hipertrofia del ventrículo izquierdo; la hipertrofia es significativamente mayor en los atletas con genotipo DD que en los heterocigotos DI. Este efecto se debe a la activación del sistema RA en el corazón, en respuesta al ejercicio, y a que la angiotensina II en el corazón actúa como un factor de crecimiento celular. Algunos estudios han demostrado que el sistema renina-angiotensina del músculo esquelético es capaz de influir en el equilibrio energético corporal general. Al evaluar la eficiencia de contracción muscular en individuos varones sanos, después de 11 semanas de entrenamiento se observó que la eficiencia energética aumentó 8.6% en individuos con genotipo II y sólo 0.39% en aquéllos con genotipo DD. Este efecto se debe a una asociación entre el fenotipo DD del gen de la ECA y un porcentaje promedio mayor de fibras tipo I (~50% vs. ~30% en genotipo II), las cuales son más eficientes que las fibras de contracción rápida cuando la actividad contráctil lleva a cabo velocidades reducidas. La evaluación del efecto sobre el $VO_{2\ máx}$ del polimorfismo I/D del gen de la ECA, en 58 mujeres posmenopáusicas mostró asociación del genotipo II con el máximo $VO_{2\ máx}$ desarrollado (6.3 ml/kg/min) que fue 23% más que el del genotipo DD, que desarrolló 3.3 ml/kg/min, 11% más que el genotipo ID. En este grupo la diferencia en el $VO_{2\ máx}$ no pudo atribuirse a diferencias en el volumen sistólico o carga cardiaca. En resumen, el alelo I mejora el desempeño de los atletas en pruebas de resistencia, efecto mediado por una mayor eficiencia mecánica de los músculos esqueléticos y la proporción de las fibras musculares. Por otro lado, el alelo D correlacionó con un fenotipo de fuerza muscular mediado por un efecto de hipertrofia muscular secundaria a un aumento plasmático y tisular de los niveles de angiotensina II.

Gen *BDKRB2*

La ECA no sólo es responsable de la génesis de la angiotensina II, sino también de la degradación de bradicinina. Por ello, los niveles de bradicinina presentan una relación inversa con los polimorfismos I/D del gen de la ECA; esto es, a mayor concentración de ECA (alelo DD) menores niveles de bradicinina, y a menores niveles de ECA (alelo II) mayor concentración de bradicinina. Los niveles de bradicinina influyen en la internalización de glucosa y el flujo sanguíneo, y previenen el crecimiento del ventrículo izquierdo del corazón vía la activación de los receptores 2 de bradicinina (B2R). La variante –9/+9 del B2R se localiza en el exón 1 del gen *BDKRB2*, ubicado en el cromosoma 14, sitio q32.1–q32.2, y se refiere a la ausencia (–9) de un segmento de 9 pb asociado con alta actividad transcripcional que tiene como consecuencia una alta expresión del receptor y, por tanto, una respuesta elevada al agonista. Como la bradicinina modula la respuesta de hipertrofia del ventrículo izquierdo, es de esperar que las variaciones alélicas del gen *BDKRB2* alteren la magnitud de este crecimiento muscular. El estudio de los polimorfismos I/D del gen de la ECA y –9/+9 del gen *BDKRB2* en 109 reclutas de la armada británica sometidos a un entrenamiento de 10 semanas, demostró una tendencia a la hipertrofia ventricular en los individuos con genotipos DD del gen de la ECA (+11.2 g frente a +6.9 g en individuos con genotipo II; $p = 0.09$) y genotipo +9/+9 en el gen *BDKRB2* (13.7 g frente a 4.6 g para el genotipo –9/–9; $p = 0.009$). La respuesta hipertrófica observada revela que la masa cardiaca de los individuos con bajas concentraciones de bradicinina y baja actividad transcripcional del B2R (genotipos DD y +9/+9) aumenta 9.5%, mientras que el ventrículo izquierdo de los individuos con altas concentraciones de bradiquinina y alta actividad transcripcional de B2R (genotipos II y –9/–9) aumenta sólo 0.4%. Por tanto, el efecto de la ECA en la hipertrofia cardiaca del ventrículo izquierdo es mediado, por lo menos en parte, por la acción de la bradicinina. La eficiencia de contracción muscular, o *eficiencia delta*, también parece estar afectada por los genotipos de *BDKRB2*. En 115 individuos sanos y 81 atletas olímpicos británicos, se valoró la eficiencia de contracción muscular como porcentaje de cambio en el trabajo realizado por minuto/porcentaje de alteración en el gasto energético por minuto en una bicicleta ergométrica. En los individuos sanos, la eficiencia delta mostró asociación de los genotipos +9/+9, +9/–9 y –9/–9 con los porcentajes obtenidos: 23.84 ± 2.41 frente a 24.25 ± 2.81 frente a 26.05 ± 2.26%, respectivamente; $p = 0.002$). Además, se valoró en conjunto la influencia del genotipo DD/II del gen de la ECA con el genotipo +9/+9 y –9/–9 del gen *BDKRB2* y se obtuvo que

entre los homocigotos al genotipo DD, la eficiencia delta muestra una tendencia a ser mayor en los homocigotos –9/–9. Aun en los individuos con genotipo II para ACE, la presencia del alelo –9/–9 influyó en la eficiencia delta de manera positiva (24.34 ± 2.51 frente a 24.26 ± 2.41 frente a 27.41 ± 2.61% para los genotipos +9/+9 frente a +9/–9 frente a –9/–9; p = 0.005). Por tanto, individuos con el genotipo II y alelo –9/–9 muestran la mayor eficiencia comparados con el genotipo DD y alelo +9/+9. En conjunto, estos datos sugieren que los polimorfismos I/D del gen de la ECA se asocian a variables funcionales en genes adyacentes y colaboran en las características fenotípicas del atleta.

Miostatina

En 2004, un sujeto alemán fue diagnosticado con una mutación en ambas copias del gen que produce la miostatina, lo que lo hacía considerablemente más fuerte que su madre, quien presentaba la mutación en un solo alelo. Más recientemente, un niño estadounidense nacido en 2005 fue diagnosticado de la misma enfermedad. Este factor de crecimiento inhibe el crecimiento de los músculos, por lo que cualquier variación genética en dicho gen que disminuya su expresión puede tener un efecto directo en la fuerza muscular; sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado ninguna asociación entre polimorfismos de este gen y el desarrollo de una mayor fuerza muscular, y sólo se han reportado mutaciones de forma esporádica (frecuencia menor a 1% en la población).

Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I

Como se mencionó anteriormente, el IGF-I desempeña un papel importante en la hipertrofia muscular y el desarrollo de fuerza muscular inducida por un entrenamiento con cargas. Un polimorfismo de repeticiones en microsatélite en la región promotora del gen se ha asociado a niveles sanguíneos mayores de IGF-I. Los individuos con la variante alélica 192 de este gen adquieren una fuerza y un desarrollo muscular mayores con entrenamientos de cargas que individuos no portadores de esta variación genética.

Aplicación de la biología molecular al deporte

El análisis de la información génica de los atletas o deportistas busca que los atletas de alto rendimiento se apoyen en la biología molecular, en la selección de sus disciplinas deportivas, y sirve para que los entrenadores mejoren los programas de entrenamiento según las características genéticas del deportista. Así, el atleta estará enfocado a un trabajo más específico y eficiente según su predisposición genética.

Las investigaciones que aplican esta tecnología al deporte desde los años noventa son abundantes y, mediante técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa, se basan en buscar las variantes génicas que permitirán a un atleta sobresalir en determinada disciplina deportiva, con la finalidad de canalizar recursos a su desarrollo, entrenamiento y preparación deportiva.

Se considera que hasta 50% de la fuerza muscular está determinada por factores genéticos. No obstante, la interpretación de lo que esto implica en cuanto al desempeño deportivo es cuestionable. La actuación deportiva se compone, además de la fuerza muscular, de varios elementos determinantes para su éxito; sin embargo, se reconoce que existen personas con ventajas genéticas para la realización de determinadas actividades físicas. El número de variaciones génicas que correlacionan potencialmente con el desempeño y rendimiento deportivo se ha incrementado, y en la actualidad se conocen 165 genes autosómicos, 5 del cromosoma X y 17 mitocondriales. El mapa genético de fenotipos asociados al desempeño y acondicionamiento físico se publica constantemente en la revista *Medicine and Science in Sports and Exercise.* La última publicación abarcaba unos 2000 genes, aunque se considera que esto sólo es la punta del iceberg y falta analizar el papel del resto de los 23000 genes codificantes en el desempeño deportivo. En el cuadro 30-2 se resumen los principales 20 genes, cuyas variantes génicas se han asociado al rendimiento deportivo. Los análisis disponibles comercialmente para el análisis genético pueden ser una guía para los jóvenes atletas o sus entrenadores en la selección de la disciplina deportiva en la cual pudieran sobresalir. En general, estas pruebas se enfocan al análisis de los genotipos del gen *ACTN3* y/o de la ECA, cuya implicación en la fuerza muscular es reconocida. El conocimiento de estas variantes alélicas pudiera ofrecer al atleta la opción de elegir entre entrenar para llegar a ser un *sprinter* o bien enfocarse a deportes de resistencia. Aunque el análisis estadístico muestra que un individuo presenta sólo 0.0005% de probabilidad de presentar las variantes alélicas benéficas a la actividad deportiva en los 23000 genes mencionados, la predisposición genética es homogénea en la población mundial, ya que, al compartir 99.99% de la información, los individuos sólo presentaran siete variantes alélicas diferentes al fenotipo ideal de las 23 variantes alélicas. Este fenotipo permitirá que los récord mundiales y olímpicos sigan mejorándose, aun sin una selección genética de los atletas.

Cuadro 30-2. Variantes génicas que influyen en el rendimiento deportivo. Conforme aumentan las variantes génicas que se incluyan en el perfil genético deportivo perfecto, la probabilidad de que un individuo los presente disminuye de forma exponencial.

Nombre del gen	Frecuencia media del genotipo óptimo en la población (%)	Probabilidad de estar presente en el genotipo deportivo perfecto (correlación de momios)	Influencia en la actividad física
ACE	21	1:5	Según el alelo, se mejora el desempeño en pruebas de resistencia o la fuerza muscular mediada por hipertrofia muscular.
ACTN3	18	1:25	La α–actina es importante para la contracción y anclaje de los filamentos musculares, lo que favorece la fuerza y potencia musculares.
ADRA2	62	1:40	Los receptores adrenérgicos median la activación de la adenilato ciclasa a través de proteína G y unen a epinefrina; por ello, variantes génicas que reduzcan su expresión pueden tener efectos ergogénicos en deportes de tiro.
ADRB2	35	1:120	
AMPD1	80	1:150	Minimiza la acumulación de ADP al metabolizar el AMP y favorece la producción de ATP.
APOE	24	1:600	Media la unión, internalización y catabolismo de partículas lipoproteicas que pueden ser empleadas en las vías energéticas.
ATP1A2*	81	1:800	Importante en la adaptación física e incrementos de $V_{O2\ máx}$ en respuesta al entrenamiento.
ATP1A2	5	1:16 000	
BDKRB2	15	1:100 000	Modula la hipertrofia del ventrículo izquierdo del corazón ante el ejercicio.
CKM	49	1:20 000	Creatina cinasa capaz de influir el $V_{O2\ máx}$ y la eficiencia delta muscular.
EPAS1*	33	1:600 000	Factor transcripcional implicado en la respuesta celular a hipoxia, como eritropoyesis, regulación vascular y metabolismo anaerobio.
EPAS1	19	1:3 millones	
HFE	4	1:85 millones	Proteína tipo MHC clase I.
H1F1A	77	1:110 millones	Proteína del MHC clase I.
HLA-A	2	1:5 500 millones	Proteína del MHC clase I.
MT-ND5*	93	1:6 000 millones	Codifica para la NADH deshidrogenasa 5, la cual forma parte del complejo I de la mitocondria necesario para la fosforilación oxidativa y la producción de ATP.
MT-ND5	7	1:85 000 millones	
MT-ND5	7	1:1.2 billones	
MT-TT	7	1:17 trillones	MT-TT es un ARN pequeño de 66 nucleótidos mitocondrial, que transfiere tironina al polipéptido creciente durante la traducción.
PPARA	70	1:25 trillones	Factor transcripcional que regula la homeostasis de lípidos, glucosa y energética.
PPRAGC1A	40	1:62 trillones	Proteína coactivadora de una serie de genes que controlan la fosforilación oxidativa.

*Los genes marcados presentan más de un polimorfismo en el gen asociado al desempeño en la actividad física.

Ejercicios de integración

Instrucciones. Complete la siguiente tabla con tres genes en cada sección, según la información contenida en el capítulo.

Expresión génica inducida por la actividad física		
	Nombre del gen	**Función del gen en la actividad física**
Genes que regulan el tamaño muscular		
Genes de la energética del músculo		
Genes cardiovasculares		
Genes del metabolismo		
Genes antioxidantes		

Bibliografía

Booth F.W., Chakravarthy M.V., Spangenburg E.E., Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. *J Physiol,* 2002;543:399–411.

Higaki Y., Mikami T., Nobuharu Fujii N., Hirshman M.F,. Koyama K., Seino T, *et al.* Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* 2008;294:E889-E897.

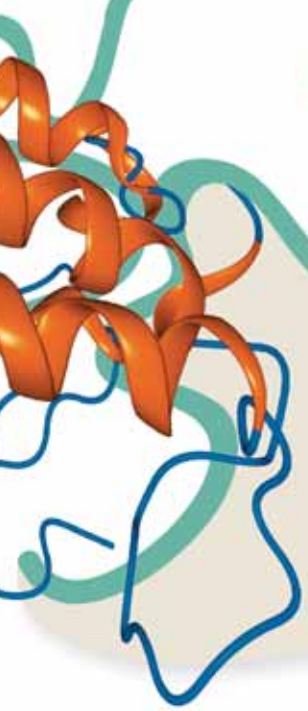
Hohmann A., Lames M., Letzelter M. *Introducción a la ciencia del entrenamiento.* Barcelona: Paidotribo, 2005.

Kostek M.C., Delmonico M.J., Reichel J.B., Roth S.M., Douglass L., Ferrell RE, *et al.* Muscle strength response to strength training is influenced by insulin-like growth factor 1 genotype in older adults. *J Appl Physiol,* 2005;98:2147–2154.

López Chicharro J., Fernández Vaquero A. *Fisiología del ejercicio.* Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2008.

Rankinen T., Bray M.S., Hagberg J.M., Pérusse L., Roth S.M., Wolfarth B., *et al.* Human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. *Med Sci Sports Exerc,* 2006;38:1863-1888.

Röckl K.S.C., Witczak C.A., Goodyear L.J. Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise. *IUBMB Life,* 2008;60:145–153.



Capítulo 31

Dopaje génico

Ana Soledad Sandoval Rodríguez / Óscar Gabriel Béjar Mejía
Adriana María Salazar Montes / Jesús Javier García Bañuelos

Introducción

El término *dopaje* se aplica a la promoción o consumo de cualquier método o sustancia prohibida en el deporte que es susceptible de mejorar el desempeño deportivo de un atleta de manera ilícita. Se cree que la palabra deriva de *dope*, una bebida alcohólica utilizada en Sudáfrica desde tiempos remotos como estimulante para las danzas ceremoniales; aunque *doping* aparece por primera vez en un diccionario inglés en 1879. En la actualidad el vocablo se asocia al uso de drogas de manera ilegal en competiciones deportivas.

Desde la época de los griegos y los romanos, el deporte goza de gran popularidad y reconocimiento social, y ya en esa época se conocía el uso de extractos de hongos, plantas y ciertas bebidas estimulantes que favorecían el desempeño de los atletas y gladiadores en la competencia o la lucha.

La idea de mejorar el desempeño deportivo es evidente a través de la historia del deporte; desde los griegos hasta la época actual, el triunfo deportivo ha adquirido un reconocimiento social, vinculado a estatus económico, éxito social y privilegios tácitos o explícitos para los deportistas victoriosos. Los triunfos deportivos son y han sido una forma de mostrar poderío por parte de las culturas, y en la sociedad actual el deportista profesional ha tomado un papel estelar. De estos hechos deriva la presión sobre los atletas no sólo para ser exitosos, sino también para ser los mejores; por esta presión, el aumento en el uso de los agentes utilizados para el dopaje dentro de la comunidad deportiva ha cobrado una importancia enorme. Las legislaciones oficiales antidopaje de los organismos reguladores del deporte, tanto nacionales como internacionales, han evolucionado desde su fundación en 1960, cuando se publicó el primer acuerdo internacional contra el uso de sustancias prohibidas. En 1963 se firmó el primer acuerdo antidopaje por el Consejo Europeo (un grupo de 21 países de Europa Occidental) que llevó a Francia y Bélgica a emitir una legislación nacional. Sin embargo, el Comité Olímpico Internacional (COI) se sumó a estas iniciativas sólo después de la muerte televisada de Tommy Simpson en el Tour de Francia en 1967, deceso vinculado al uso de sustancias dopantes. La comunidad médica del COI se estableció en 1967 y en los Juegos Olímpicos de México 1968 se realizaron por primera vez pruebas antidopaje. En 1998, otro escándalo dentro del Tour de Francia obligó al COI a congregar a los organismos involucrados en el deporte en Lausana, Suiza, donde se llevó a cabo la Conferencia Mundial sobre Dopaje en el Deporte, que concluyó con la *Declaración de Lausana sobre Dopaje en el Deporte*. Aunado a esto, se creó la Agencia Mundial Antidopaje (AMA; *World Anti-Doping Agency*, WADA), con arbitraje internacional e independiente del COI, la cual se estableció oficialmente en noviembre de 1999 y entró en operación en los Juegos Olímpicos de Sidney 2000. Para los Juegos Olímpicos de Atenas 2004, se efectuaron 2 800 pruebas antidopaje a más de 10 000 atletas de distintos países**.** Los hechos históricos que marcan la evolución del dopaje se exponen en el cuadro 31-1.

Clasificación del dopaje según la agencia mundial antidopaje

Las sustancias usadas para incrementar el rendimiento deportivo han evolucionado junto con los avances médicos. Las sustancias y prácticas que se emplean como dopaje tienen su origen en estrategias terapéuticas desarrolladas para alguna enfermedad, las cuales han sido corrompidas para su uso como agente dopante. Esta evolución se origina desde el uso de esteroides hasta la lista de sustancias y métodos prohibidos que anualmente publica la AMA y que en la actualidad incluyen estimulantes, bloqueadores beta, analgésicos, narcóticos, diuréticos, anabólicos, hormonas y sustancias

Cuadro 31-1 Reseña cronológica de eventos trascendentes en el dopaje. La idea de ingerir productos que aumenten la fuerza, la resistencia o la capacidad aeróbica es ancestral. La institucionalización del deporte en 1896 con la celebración de los Juegos Olímpicos en Atenas fomentó la competición deportiva internacional, lo que desató la búsqueda de fármacos capaces de mejorar el rendimiento deportivo. Por desgracia, la tragedia ha acompañado al dopaje y se han registrado varias muertes por sobredosis o se han presentado efectos secundarios.

Fecha	Eventos
400 a 800 a. C.	En Grecia se utilizaban dietas especiales y pociones estimulantes para fortificarse.
100 d. C.	En Roma, los corredores de carruajes alimentaban a sus caballos con una mezcla que los hacía correr más rápido. Los gladiadores eran dopados con extractos de hongos y gérmenes de plantas.
200 a 300	Griegos y romanos utilizaban hidromiel como estimulante del SNC, así como vino por sus efectos inhibidores y relajantes.
300 a 1800	Es difícil encontrar evidencia escrita sobre este periodo, pues la sabiduría sobre el dopaje fue ocultada por sacerdotes y médicos de la época.
1865	El primer caso documentado de dopaje fue en la prueba de natación del Canal de Amsterdam. Se describió como la toma de una droga desconocida que incrementaba la resistencia.
1867	Para las competencias ciclistas de seis días, los competidores franceses consumían mezclas a base de cafeína, los belgas usaban azúcar mezclada con éter, y otros grupos ingerían bebidas alcohólicas o incluso nitroglicerina.
1896	La primera muerte registrada a causa de dopaje fue del ciclista inglés Arthur Linton. Falleció por una sobredosis de efedrina.
1904	El atleta Tom Hicks se desplomó luego de ganar el maratón de St. Louis. Los médicos descubrieron que había ingerido estricnina y coñac antes de la competencia.
1910	Se llevó a cabo el primer control antidopaje en caballos.
1930	Inició la producción de anfetaminas.
1950	Atletas soviéticas utilizaron hormonas masculinas para aumentar su potencia y resistencia. En respuesta, en Estados Unidos se desarrollaron los primeros esteroides.
1960	En los Juegos Olímpicos de Roma se registró la primera muerte a causa de sobredosis de anfetaminas, en la persona del ciclista danés Kurt Jensen.
1964	En el marco de los Juegos Olímpicos de Tokio se realizaron las primeras pruebas antidopaje en humanos, exclusivamente a ciclistas.
1967	Se elaboró la primera lista de sustancias prohibidas.
1968	Se realizó el primer control antidopaje en atletismo, en los Juegos Olímpicos de México.
1988	Ben Johnson, ganador de 100 m planos en los Juegos Olímpicos de Seúl, resultó positivo por estanozolol, un esteroide anabólico androgénico prohibido. Fue despojado de su medalla y suspendido durante dos años.
2005	El dopaje génico fue publicado como método prohibido por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA).
2008	Se presume que los Juegos Olímpicos de Beijing pudieron ser el primer foro donde aparecieron deportistas modificados genéticamente.

análogas. De igual manera, como métodos prohibidos considerados dopaje están la transfusión sanguínea y el dopaje génico, así como la manipulación química o física de las muestras biológicas. La definición de cada uno de estos métodos se expone en el cuadro 31-2.

Dopaje génico

Los avances de las últimas décadas en el área de la biología molecular han acuñado nuevos conceptos e ideas, como la terapia génica, que consiste en el uso terapéutico de la información genética para suplementar o modificar el repertorio genético de las células, con la idea de curar enfermedades. El empleo impropio de la terapia génica ha llevado a lo que se conoce como *dopaje génico*, que se define, según la AMA, como el uso de genes, elementos genéticos y/o células sin un fin terapéutico, que tengan la capacidad de promover, de forma exacerbada, el rendimiento físico. El dopaje génico se realizaría introduciendo ADN o ARN a los órganos o tejidos de los atletas, para modificar su expresión génica con la finalidad de que ello produzca un mayor rendimiento deportivo. El envío de genes a los tejidos de los atletas puede realizarse con las mismas estrategias desarrolladas para la terapia génica; esto es, mediante la administración de genes en vectores virales o plásmidos, o empleando la pistola de genes, o si se busca la inhibición de la expresión génica, mediante moléculas de ARN interferentes en virus recombinantes (para más detalles, véase el capítulo 27, Terapia génica).

Sin embargo, debe considerarse que la mayoría de las proteínas que producen los genes propuestos en el dopaje génico ya están disponibles comercialmente de manera

Cuadro 31-2. Sustancias y métodos prohibidos por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA). Esta lista engloba la clasificación de la AMA para las sustancias y métodos prohibidos que se consideran dopaje. La lista oficial con los nombres científicos de las sustancias de cada una de las clasificaciones se actualiza y publica cada año, y puede consultarse en http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List/.

		Mecanismo	Efectos
Sustancias prohibidas	Agentes anabolizantes	Sustancias sintéticas generalmente derivadas de la testosterona.	Ayudan al cuerpo a absorber las proteínas; desarrollo de la masa muscular y ósea.
	Hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias afines	- Eritopoyetina (EPO) - Hormona del crecimiento (GH) - Factor de crecimiento tipo insulina-1 (IGF-I) - Factores de crecimiento mecánicos (MGF) - Gonadotropinas (LH, hGC) - Insulina - Corticotropinas	Estimulan la producción de eritrocitos; aumentan el tamaño de los músculos y otros tejidos; producen lipólisis; retardan los efectos del envejecimiento; regulan la secreción de testosterona; favorecen el aumento rápido de estatura; disminuyen la glucosa sanguínea.
	Agonistas beta-2	- Inhiben la activación de la adenilciclasa, cerrando los canales de calcio y produciendo relajación del músculo liso. - Inducen la respuesta a catecolaminas sobre los receptores adrenérgicos beta-2.	Broncodilatación; reducen el broncoespasmo o respiración entrecortada inducidos por ejercicio; incrementan el flujo de aire a los bronquios y, con ello, aumentan la captura de oxígeno.
	Antagonistas y moduladores hormonales	Sustancias con efectos antiestrogénicos o inhibidores de la miostatina.	Aumento de volumen y masa muscular.
	Diuréticos y agentes enmascarantes	- Diurético: toda sustancia que al ser ingerida provoca la eliminación de agua y sodio a través de la orina. - Enmascarante: sustancia que tiene la intención de cubrir o diluir una sustancia para dopaje.	Eliminación urinaria de la sustancia dopante, lo que impide la detección de dicha sustancia en la muestra biológica; ajuste en peso corporal por la eliminación de agua.
Métodos prohibidos	Métodos para incrementar la transferencia de oxígeno	- Dopaje sanguíneo autólogo, homólogo o heterólogo o de eritrocitos. - Administración de hemoglobina modificada, perfluorocarbonos o efaproxiral.	Aumento de eritrocitos en sangre, con lo que se incrementan la oxigenación muscular y, con ella, el rendimiento y/o la resistencia.
	Manipulación física o química de la muestra	- Sustitución o alteración de la muestra. - Infusiones intravenosas o cateterización urinaria.	Sustitución y/o adulteración de la muestra.
	Dopaje génico	Transferencia de ácidos nucleicos, células normales o modificadas genéticamente, agentes que alteran de forma directa o indirecta la expresión genética	Aumento de la fuerza muscular; incremento del porcentaje de las fibras de contracción rápida; aumento de la resistencia; efectos a largo plazo desconocidos.

recombinante y producen los mismos efectos que el dopaje génico.

Hasta la publicación de este libro, no se tiene conocimiento de algún caso oficial de dopaje génico. Sin embargo, en los Juegos Olímpicos de Invierno de Turín 2006 se sospechó del uso de Repoxygen (producto de Oxford Biomedica, Inc.) por parte del entrenador alemán Tomas Sprinsgstein en su equipo de gimnasia. Este producto es la presentación comercial del gen de la eritropoyetina (EPO), que contiene un elemento de respuesta (véase el capítulo 7, Regulación de la expresión génica) sensible a las concentraciones de oxígeno. El caso no pudo comprobarse, y sólo quedó como sospecha al encontrársele al entrenador alemán un correo electrónico en que se quejaba con la compañía de lo difícil que era conseguir el producto.

Sin embargo, la expectativa para Londres 2012 fue que serían las primeras olimpiadas donde se presentaran atletas modificados genéticamente.

En la AMA y el COI existe preocupación debido a que hasta el momento no hay manera de detectar esta forma de dopaje por los métodos convencionales de control, ya que las proteínas codificadas por estos genes no son diferentes de las adquiridas endógenamente por el organismo, y aunque los niveles elevados circulantes de alguna proteína pudieran ser indicativos de dopaje génico, sólo la biopsia del órgano al que se envió el gen (como el músculo) podría considerarse una prueba contundente para su detección.

Genes candidatos para el dopaje génico

Los genes que se han sugerido que podrían ser utilizados como agentes dopantes incluyen el gen de la hormona de crecimiento (HC), de la EPO, del receptor activado por proliferadores de peroxisomas delta (*peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR-δ), del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (*insulin growth factor-I*, IGF-I), del factor de crecimiento de hepatocitos (*hepatocyte growth factor*, HGF), así como algunos sistemas para el bloqueo del gen de la miostatina. Sus características primordiales y aplicaciones se indican en el cuadro 31-3.

La idea de la suplementación génica con estos productos en particular va enfocada a que se incremente la fuerza

Cuadro 31-3. Genes empleados para el dopaje génico. Las posibles aplicaciones de estos genes se fundamentan en que pueden mejorar la fuerza, velocidad, resistencia o capacidad aeróbica del atleta, y afectar de forma positiva el rendimiento en diversas disciplinas deportivas como las mencionadas. Estrategias de terapia génica ya están disponibles con estos genes, como el IGF-I, que se aplica terapéuticamente a pacientes con distrofia muscular mediante virus adenoasociados.

Gen	Características del gen	Disciplina deportiva que beneficia
IGF-1	Esta proteína estimula el incremento de la masa muscular, debido a hiperplasia.	Atletismo: carreras de fondo y medio fondo; ciclismo de ruta, natación, futbol, triatlón.
HC	La hormona de crecimiento induce hipertrofia muscular y retarda los efectos del envejecimiento por estimulación del hígado para la producción de factores de crecimiento endógenos. Como agente dopante suele administrarse de forma local en el músculo.	Atletismo: carreras de velocidad, lanzamientos; halterofilia, fisicoculturismo, ciclismo de pista, natación, lucha y otros deportes de combate.
EPO	La eritropoyetina estimula la producción de eritrocitos en la médula ósea, por lo que es un medio para aumentar la fuerza física. Su uso como agente dopante puede provocar un gasto cardiaco mayor debido a la concentración elevada de hematíes en sangre; esto requeriría una extracción sanguínea para aligerar la sobrecarga cardiaca.	Ciclismo de ruta, maratón, ultramaratón, triatlón, carreras de fondo.
PPAR-δ	Incrementa la cantidad de fibras de contracción lenta, con lo que la resistencia a la fatiga se incrementa.	Atletismo: carreras de fondo y medio fondo, maratón; ciclismo de ruta, esquí nórdico, tenis.
Bloqueadores de la miostatina	Estos agentes producen crecimiento de la masa muscular e inducen el anabolismo, a la vez que inhiben la litogénesis y la acumulación de grasa.	Halterofilia, fisicoculturismo; atletismo: carreras de velocidad, lanzamientos.
HGF	El factor de crecimiento de hepatocitos es capaz de inducir la proliferación de las células satelitales musculares después de un ejercicio exhaustivo o de un traumatismo.	Ciclismo, atletismo, halterofilia, gimnasia, canotaje.

muscular (lo que podría ser útil en deportes como la halterofilia, el lanzamiento de disco, el judo, etc.), se aumente la capacidad cardiaca o respiratoria (estrategia de utilidad en deportes aeróbicos, como las carreras, natación, ciclismo, futbol y otros), o bien a que se incremente la resistencia ventajosa en maratones o ciclismo, entre otros.

A continuación se describen algunos de los mecanismos moleculares del fundamento de uso de estos genes como dopaje.

Hormona de crecimiento

Las células somatotropas de la pituitaria anterior secretan HC a manera de pulsos, los cuales son regulados por dos péptidos hipotalámicos con efectos contrarios entre sí: el péptido liberador de la HC (estimulador de su secreción) y la somatostatina (inhibidor de su liberación).

La HC realiza sus efectos biológicos a través de la unión a receptores específicos presentes en las células de todo el cuerpo. La secreción de esta hormona llega a mostrar sus niveles máximos durante la pubertad, presenta concentraciones ligeramente mayores en la mujer y disminuye alrededor de 14% por cada década de vida. Condiciones como el ejercicio, el sueño, el estrés y la fiebre estimulan de manera fisiológica la secreción de esta proteína, mientras que sustancias (producidas endógenamente o bien, administradas de manera exógena) como la clonidina, la L-dopa, el c-hidroxibutirato, los andrógenos y los estrógenos incrementan su liberación. El efecto del dopaje con esta hormona, y en el caso de dopaje génico con el gen de la HC, está rodeado de controversia. Sus efectos pueden ser directos en los tejidos, pero en la masa muscular éstos son mediados en su mayoría por el IGF-I, que se estimula en respuesta a la HC. Los efectos más notorios incluyen la hipertrofia muscular en un corto periodo y la estimulación del hígado para la producción de factores de crecimiento endógenos, que ocasionan, a su vez, varios efectos en el cuerpo. Sin embargo, el hígado sólo es capaz de producir estas sustancias en ciertas cantidades, por lo que el efecto es limitado. El dopaje con la proteína recombinante es usual en los atletas de élite, y la terapia génica para esta proteína, originalmente desarrollada para niños con deficiencia de la hormona, incluye el uso de retrovirus como vectores génicos. Estos vectores aseguran la expresión persistente y el control del gen bajo un promotor fuerte para la obtención de niveles terapéuticos constantes de la proteína. La administración del gen para efectos dopantes suele realizarse de manera local en el músculo.

Eritropoyetina

Este gen sobreexpresa la proteína EPO, normalmente producida por las células renales en respuesta a una disminución en la oxigenación sanguínea, para estimular la producción de eritrocitos en la médula ósea. Los glóbulos rojos son los encargados de transportar el oxígeno en la sangre y hacerla llegar a las células corporales, por lo que un incremento de estas células repercutiría en una oxigenación

corporal mayor y, con ello, incrementaría el rendimiento atlético. El uso de esta proteína como medio para aumentar la resistencia, especialmente en maratonistas y ciclistas, es bien conocido. La administración del gen de la EPO humana induce la producción de la proteína, la cual no puede detectarse como sustancia exógena, ya que es idéntica a la producida de manera endógena por el organismo; por tanto, no se detecta en las pruebas antidopaje convencionales. Los estudios realizados en monos tratados con el gen de la EPO, enviado mediante vectores adenoasociados (AAV) (véase el capítulo 27, Terapia génica), administrados en el músculo y/o el pulmón, demuestran un incremento de hasta 100 veces en los niveles basales de EPO. Así, las concentraciones máximas de proteína EPO se alcanzaron a los 20 días posadministración, después de una dosis de 1×10^{13} genomas/kg de peso, manteniendo una expresión estable de la hormona y un incremento permanente del hematocrito. Como efecto indeseable, los animales de experimentación requirieron flebotomías constantes para mantener unos niveles adecuados de hematocrito. Sin embargo, a las tres semanas posadministración, en dos de cada cinco animales a los que se les administró la proteína en el músculo y tres de cada tres animales que recibieron el AAV por el pulmón se desarrolló una anemia grave. La causa fue una respuesta autoinmune desarrollada contra la EPO, revelada por la presencia de anticuerpos. Estos estudios demuestran la necesidad de limitar su aplicación, debido a que los efectos secundarios presentados se consideran graves, hasta que nuevas pruebas demuestren una terapéutica más segura con este transgén.

Según estas pruebas, se ha especulado que el uso de la EPO como agente dopante podría provocar un mayor gasto cardiaco, debido a la elevada concentración de hematíes en sangre, lo que requeriría de una extracción sanguínea para aligerar la sobrecarga cardiaca (similar a lo que ocurre en los animales de experimentación). En suero, la proteína recombinante parece ser susceptible de detección por diferencias en la migración eléctrica con respecto a la proteína silvestre. Debido a que esta prueba suele realizarse en la orina, los métodos habrán de adecuarse a esta muestra biológica.

Factor de crecimiento similar a insulina tipo I

Esta proteína interactúa con las células de las fibras musculares, estimulando el incremento de la masa muscular, debido a una hiperplasia. Los experimentos con ratones transducidos con VAA que contienen IGF-I indican que la musculatura se desarrolla prácticamente al doble, particularmente por el aumento de las fibras rojas (resistentes a la fatiga). Los experimentos con el llamado "ratón Schwarzenegger", con administración de 10^{10} genomas de vectores AAV en el espacio intersticial del músculo, demostraron un incremento de 15% en la masa muscular y de hasta 14% en la fuerza. Estos beneficios persisten aun sin ejercicio y previenen el desgaste muscular asociado a la edad (los mamíferos pierden un tercio de su masa muscular y fuerza conforme envejecen), ya que la distribución de las fibras musculares y la masa se mantienen en niveles similares a los músculos jóvenes; esto debido al estimulo del IGF-I en las células satélite, que aumenta la fuerza en los músculos hasta en 27%.

Receptor activado por proliferadores de peroxisomas delta

Es un regulador de gran cantidad de genes, y conduce a incrementar la tasa del metabolismo de los lípidos y a un aumento de las fibras musculares de contracción rápida, con lo que se generan músculos con mayor resistencia al agotamiento. Las investigaciones conducidas por Ronald M. Evans, investigador del Instituto Médico Howard Hughes, demostraron que en varios tejidos, particularmente adiposos, la activación de PPAR-δ aumenta la quema de grasas y, en consecuencia, disminuye la masa del tejido adiposo. Esto ha generado el llamado "ratón maratón", el cual es capaz de correr el doble de distancia y el doble de tiempo que un ratón normal. Además, los ratones alterados genéticamente que sobreexpresan este gen son resistentes al aumento de peso cuando se les dan dietas altas en calorías y grasa, y mantienen niveles más bajos de triglicéridos intramusculares.

Factor de crecimiento de hepatocitos

Aunque esta proteína se aisló por su capacidad para estimular la proliferación de células hepáticas, se conoce que es producida por gran cantidad de células en todo el organismo. Es capaz de activar las células satelitales musculares después de un ejercicio exhaustivo o de un traumatismo, las cuales proliferan y se diferencian a un nuevo músculo. El beneficio probable del uso de este gen es el incremento del número de fibras musculares. En la figura 31-1 se esquematizan los probables efectos del dopaje génico con HGF al funcionar como promotor del crecimiento y movilidad celular, mitogénesis, morfogénesis y regeneración tisular, especialmente en células de origen epitelial, promoviendo la angiogénesis y el crecimiento muscular.

Bloqueadores de la miostatina

La miostatina (también conocida como factor 8 de crecimiento y diferenciación) es producida por células del músculo esquelético y actúa como un regulador negativo del crecimiento de la masa muscular; retrasa el desarrollo de las células madre musculares por mecanismos aún desconocidos. La miostatina es un agente altamente catabólico o antianabólico, y promueve la lipogénesis y la acumulación de grasa. El interés en su utilización surge del conocimiento de que la raza bovina Azul Belga, destacada por su alto contenido de músculo magro, presenta una mutación en el

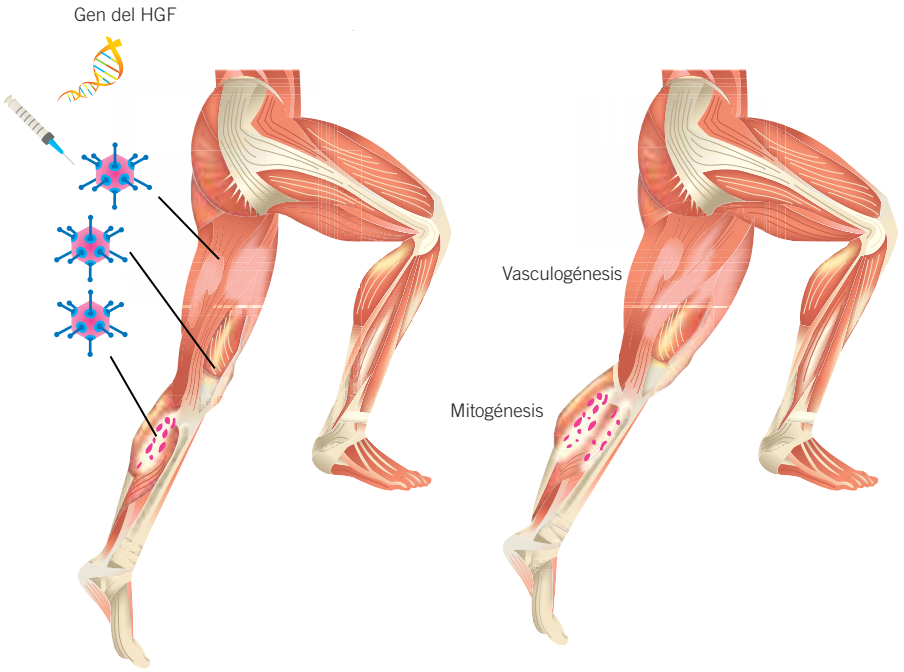


Figura 31-1. Efectos del dopaje génico con el gen HGF. Esta imagen esquematiza los posibles beneficios de la suplementación génica con HGF en atletas, los cuales podrían incluir el desarrollo de mayor masa muscular, la cual tendría mejor irrigación y, por tanto, aumentaría su rendimiento.

gen de la miostatina. Diversos experimentos desarrollados desde entonces indican que los ratones *knockout* para este gen son alrededor de dos veces más fuertes que los ratones normales. Así, en 2001, el doctor Se-Jin Lee, mediante la inserción de mutaciones que aumentan la producción de bloqueadores de la miostatina, creó ratones con una gran masa muscular. Hasta esta edición, no se dispone de fármacos en el mercado que inhiban la miostatina en los seres humanos, pero sí existen anticuerpos que reconocen la miostatina y la neutralizan, desarrollados por la compañía farmacéutica Wyeth. El inhibidor se denomina MYO-029 y está actualmente en fase experimental en humanos; sin embargo, la demanda de los atletas ha llevado a que se vendan falsos inhibidores de miostatina como ayuda ergogénica.

Conclusiones y perspectivas

Es importante ser conscientes de que la idea del dopaje génico no es descabellada; si bien no se tiene la certeza de su uso en la actualidad, su utilización se vislumbra en un futuro muy cercano. Hoy día, puede afirmarse que el uso inadecuado de estas tecnologías sólo puede interpretarse como una trampa; sin embargo, la sociedad actual tiene marcadas tendencias antiedad y proestéticas, lo que puede originar un cambio en el modo de pensar actual, de tal manera que llegue el momento en que estas estrategias no sólo las requerirán los atletas, sino la sociedad en general, lo que modificará por completo la manera de pensar, y pasará de ser una práctica prohibida a una permitida de acuerdo con las demandas de la sociedad.

Ejercicios de integración

En este esquema, complete las celdas faltantes de los efectos de la suplementación génica:

Gen	Beneficios en el deporte	Deportes en los cuales su empleo sería beneficioso
Hormona de crecimiento		
	Mitogénesis y angiogénesis	
		Maratón, carreras de fondo
	Desarrollo muscular, aumento de fuerza	

Bibliografía

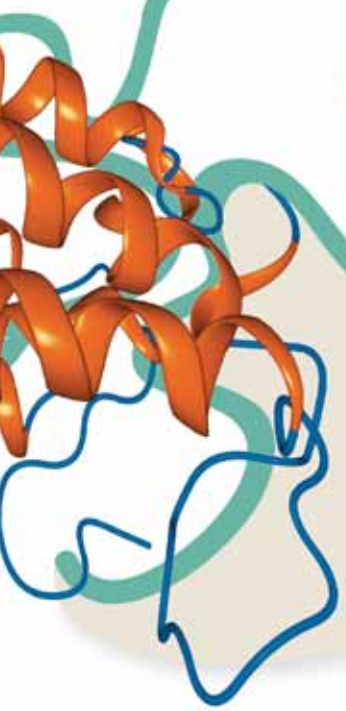
Barton-Davis E.R., Sweeney H.L., Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci,* 1998;95:15603-15607.

Gao G., Wilson J.M. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood,* 2004;103:3300-3302.

Lasne F., Martin L., De Ceaurriz J., Larcher T., Moullier P., Chenuaud P. "Genetic doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol Ther,* 2004;10:409-410.

Wang Y.X., Evans R.M. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR-delta. *PLoS Biol,* 2004;2:1532-1539.

World Anti-Doping Agency. *The 2011 Prohibited List International Standard.* Montreal: World Anti-Doping Agency, 2010.



Capítulo 32

Proyecto del Genoma Humano: aportaciones a la medicina

Adriana María Salazar Montes / Luis Daniel Hernández Ortega
Juan Armendáriz Borunda

Introducción

El genoma se define como el conjunto de pares de bases contenidos en el ADN de cada organismo. En el caso del hombre, la cantidad de nucleótidos que constituyen el genoma humano es de 3 000 millones, los cuales están contenidos en 23 pares de cromosomas. La mayor parte de este ADN se encuentra en el núcleo, aunque también se halla ADN en la mitocondria. Gracias al Proyecto del Genoma Humano (PGH), hoy día se sabe que el ADN del ser humano está conformado por 23 000 genes y no por 100 000, como se creía. La información contenida en estos genes se ha descodificado y permite establecer que el genoma contiene la información necesaria para el diseño de las estructuras celulares y para todas las funciones que realizan las células. En la actualidad, el análisis de los genes, mediante estudios moleculares y genéticos permite la predisposición de las personas a desarrollar ciertas enfermedades.

El PGH surgió ante la necesidad de conocer la información de la que estamos formados los humanos. Es el primer proyecto en la historia de la biología coordinado internacionalmente en el que participaron un número considerable de países como Francia, Alemania, Japón y China, liderados por Estados Unidos y Gran Bretaña.

El PGH inició en 1990 y se puso como objetivo concluirlo en 15 años, es decir, en 2005. Tras 10 años de intensa investigación, el 26 de junio de 2000 se anunció de forma conjunta, por el entonces presidente de Estados Unidos, Bill Clinton, y el primer ministro británico, Tony Blair, la publicación del primer borrador del mapa genético humano, con 95% del genoma secuenciado. Dicho trabajo se publicó en las dos revistas científicas de mayor prestigio: *Nature* y *Science*. El proyecto completo se terminó en 2003, dos años antes de lo previsto, lo cual coincidió con el 50 aniversario de la publicación del trabajo de Watson y Crick, en que propusieron la estructura de la doble hélice del ADN, publicado en 1953.

Aunque el objetivo inicial del PGH fue conocer la secuencia de pares de bases de todo el ADN conforme se fue avanzando en este proyecto se planteó la necesidad de organizar la información obtenida y se crearon mapas genéticos y físicos con esta información. Craig Venter, de Rockville, MD, en Estados Unidos, creó la empresa Celera Genomics exclusivamente para este fin. Se analizaron por separado las regiones de ADN codificante y el ADN altamente repetitivo. Además, se crearon programas de computación, algoritmos y computadoras que permitieran analizar las secuencias y les dieran un sentido biológico (figura 32-1).

Objetivos del Proyecto del Genoma Humano

Los objetivos centrales del PGH fueron los siguientes:

- Conocer la totalidad de genes que están contenidos en el ADN humano.
- Determinar la secuencia de 3 000 millones de nucleótidos que conforman el ADN.
- Organizar y almacenar la información obtenida en bases de datos.
- Desarrollar tecnologías que permitan secuenciar al ADN de manera rápida y efectiva.
- Desarrollar las herramientas adecuadas para realizar análisis rápidos y precisos de toda la información recabada.
- Establecer leyes que regulen los aspectos éticos, legales y sociales relacionados con el genoma humano del proyecto.

Aportaciones del Proyecto del Genoma Humano

Entre los datos más interesantes obtenidos tras la conclusión del Proyecto del Genoma Humano destaca el hecho de

Figura 32-1. Proyecto del genoma humano. El genoma se define como el conjunto de pares de bases contenidas en el ADN de cada organismo. El genoma humano está constituido por 3000 millones de pares de bases contenidas en 23 pares de cromosomas.

que los seres humanos están conformados por aproximadamente 23000 genes codificantes, muchos menos de lo que se esperaba, ya que se creía que nuestro genoma contenía 100000 genes. El número de genes es relativamente pequeño si se compara con los de otros organismos inferiores filogenéticamente, como el gusano nematodo, que tiene 18000 genes, y la mosca de la fruta, con 13000. De acuerdo con la información contenida en los mapas genéticos de diversas especies animales existen evidencias contundentes que apuntan a que los chimpancés son los animales más cercanos genéticamente a los seres humanos, ya que se comparte 99.9% del ADN y sólo difiere en 0.1% del genoma. Esta información apoya fuertemente la teoría del origen de la evolución propuesta por Darwin en que se plantea que las diversas especies animales, incluyendo el hombre, son producto de la evolución y la selección natural, dejando en entredicho la teoría religiosa que postula que la aparición del hombre es producto de una actividad divina. Entre los diferentes individuos de la raza humana se encontró que sólo difieren en 0.01% de su genoma; es decir, los humanos comparten 99.99% del ADN (figura 32-2).

Genoma humano: patrimonio de la humanidad

El conocimiento de la secuencia del genoma humano deja latente la posibilidad de que el genoma de los individuos sea manipulado con la finalidad de satisfacer intereses individuales y egocentristas. Los laboratorios privados que participaron en el PGH y que invirtieron enormes cantidades de dinero pelean por la propiedad intelectual de los conocimientos generados por el PGH. Es importante mencionar que los fondos destinados para la realización del PGH provinieron tanto de fondos gubernamentales de Estados Unidos, Gran Bretaña y otros países (es decir, dinero de los contribuyentes) como privados, por lo que las intenciones de estas compañías privadas de negar el acceso al conocimiento obtenido bloqueando los posibles beneficios médicos de la genética a la humanidad no tienen razón de ser.

Con relación a lo anterior, un grupo de científicos que promulgan que "la ciencia está libre de negocio" fundaron una organización llamada HUGO (Human Genome Organization), que protege a la información contenida en el genoma humano de su comercialización, ya que de permitir estas acciones se estaría transformando un conocimiento "natural" en una posible reserva de mercados para posteriormente explotarlos comercialmente. En respuesta a las disputas generadas en relación con el tema, la UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura) declaró que el conocimiento del genoma humano es *patrimonio de la humanidad*. Este estamento promovió la promulgación de leyes que controlen y acoten esta nueva área de la ciencia y creó la Declaración sobre *dignidad y genoma humano* en donde destacan los siguientes apartados:

1. El genoma humano es la base fundamental de la especie humana y por tanto *el genoma humano es patrimonio de la humanidad*.
2. Todo individuo tiene derecho al respeto de su dignidad y derechos, cualesquiera que sean sus características genéticas.

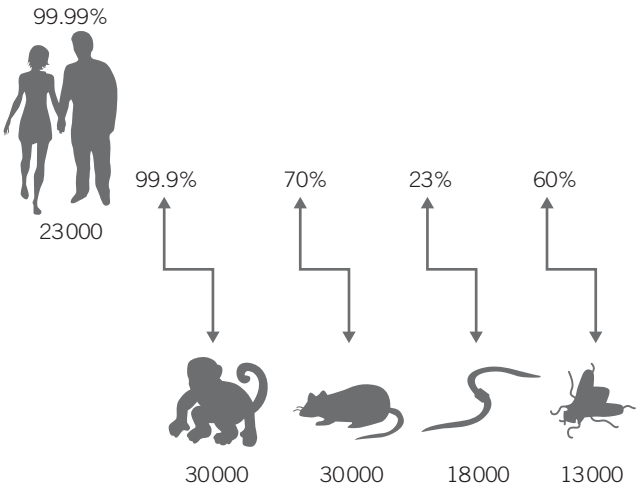


Figura 32-2. Homología génica entre especies. Los resultados del Proyecto del Genoma Humano indican que el humano está conformado por 23 000 genes, no tan lejos filogenéticamente del gusano nematodo, que tiene 18000 genes, y la mosca de la fruta, con 13000. Los chimpancés son los animales más cercanos genéticamente al hombre con 99.9% de homología. Entre humanos hay una diferencia de tan sólo 0.01%.

3. El genoma humano, en su estado natural, no puede dar lugar a beneficios pecuniarios.
4. Cualquier investigación, tratamiento o diagnóstico que involucre la manipulación del genoma de un individuo debe contar con el consentimiento previo, libre e informado de la persona interesada y sólo podrá efectuarse previa evaluación rigurosa de los riesgos y las ventajas que entrañe y de conformidad con cualquier otra exigencia de la legislación nacional.
5. Ninguna investigación relativa al genoma podrá prevalecer sobre el respeto de los derechos humanos, de las libertades fundamentales y de la dignidad humana de los individuos.
6. Toda persona tendrá derecho, de conformidad con las legislaciones nacionales e internacionales correspondientes, a la reparación equitativa de un daño ocasionado por una intervención en su genoma.
7. Toda persona tiene el derecho de ser informada de los resultados de un examen genético y de sus consecuencias.
8. Nadie podrá ser objeto de discriminaciones fundadas en sus características genéticas, de lo contrario se estaría atentando contra sus derechos humanos y libertades fundamentales.
9. Están prohibidas las prácticas contrarias a la dignidad humana, como la clonación con fines de reproducción de seres humanos.
10. Es derecho fundamental del individuo el acceso a los procedimientos biológicos, genéticos y médicos en materia de genoma humano, respetándose su dignidad y derechos.
11. Las investigaciones sobre el genoma humano en el campo de la biología, la genética y la medicina, deben orientarse a aliviar el sufrimiento y mejorar la salud del individuo y de toda la humanidad (figura 32-3).

Figura 32-3. Genoma humano: patrimonio de la humanidad. El genoma humano es la base fundamental de la especie humana y, por tanto, es patrimonio de la humanidad. Todo individuo tiene derecho a que se respete su dignidad y derechos, cualesquiera que sean sus características genéticas. Nadie podrá ser objeto de discriminaciones fundadas en sus características genéticas, de lo contrario se estaría atentando contra sus derechos humanos y libertades fundamentales.
En su estado natural, el genoma humano no puede dar lugar a beneficios pecuniarios.

El Proyecto del Genoma Humano en la medicina

Hasta antes del conocimiento del genoma humano, el papel del médico en la sociedad era tratar de devolver al paciente el estado natural de salud. Un médico molecular puede modificar el programa genético de su paciente e informarle de cuáles alimentos o fármacos le conviene ingerir de acuerdo con su carga genética y qué predisposición presenta para desarrollar enfermedades o adicciones. Esto significa que, además de conocer el vínculo existente entre un gen y una enfermedad, también se podrá conocer la reacción de un paciente a un determinado medicamento. En un futuro no muy lejano habrá medicamentos personalizados, producidos a la medida de cada paciente, con lo que se logrará una mayor eficacia terapéutica. En términos económicos esto representa enormes ganancias para las industrias farmacéuticas. Las enfermedades podrán atacarse antes de que se presenten, ya que podrán ser diagnosticadas durante el embarazo o en el nacimiento. Enfermedades tan comunes como el cáncer, el sida o las afecciones cardiacas pasarán a ser historia. Además, se estima que para el año 2030 se habrán identificado los genes que regulan el envejecimiento celular, por lo que existe la posibilidad de tener una vida más prolongada (figura 32-4).

Una vez que se conozca la relación directa entre genes y enfermedad, los métodos diagnósticos de elección serán, sin duda, los métodos moleculares, los cuales son muy precisos y altamente sensibles, dejando de lado la necesidad de solicitar segundas y terceras opiniones de expertos médicos para asegurar el diagnóstico. De manera general, a medida que se descubra la causa genética de muchas enfermedades, la mayoría de ellas incapacitantes, disminuirá la morbilidad, desaparecerán muchas enfermedades genéticas y se economizarán millones de dólares en servicios de salud.

Por otro lado, aunque las enfermedades se diagnostiquen oportunamente, para la mayor parte de ellas se seguirá sin disponer de terapias eficaces, lo que crea el inquietante problema de lo que alguien ha llamado el "enfermo-sano", que es aquella persona que en el momento actual es sana pero que sabe que en 30 años desarrollará una enfermedad genética mortal. Este conocimiento generará, sin lugar a dudas, un sentimiento de ansiedad en los afectados, por lo

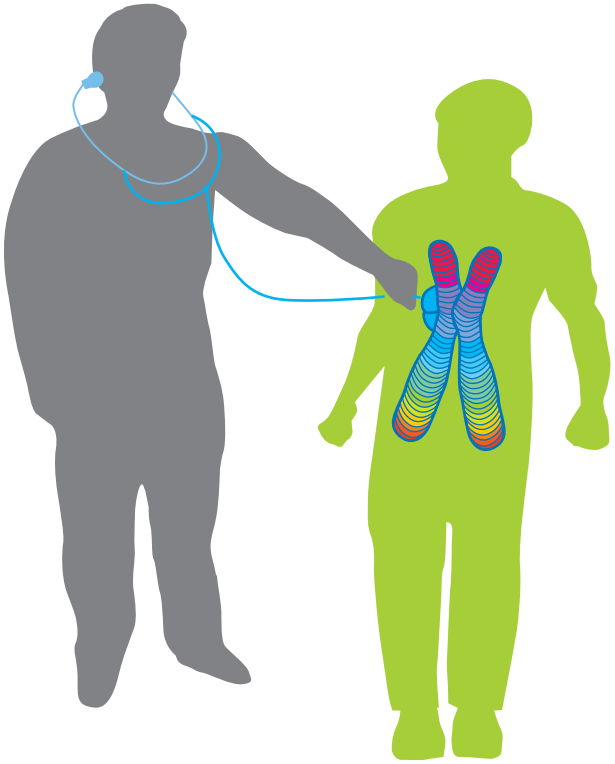


Figura 32-4. El genoma en la medicina. Un médico molecular puede ser capaz de modificar el programa genético de su paciente e informarle de cuáles alimentos o fármacos le conviene ingerir de acuerdo con su carga genética. Una vez conocido el vínculo existente entre gen y enfermedad se puede conocer la reacción de un paciente a un medicamento. En el futuro habrá medicamentos personalizados, producidos a la medida de cada paciente.

que la pregunta obligada, entonces, es: ¿se gana algo con este conocimiento?

Sondeo prenatal de enfermedades

En la actualidad, es posible extraer células fetales a partir de líquido amniótico y de vellosidades coriónicas para el diagnóstico de enfermedades genéticas antes del nacimiento. Incluso, investigaciones recientes indican que es posible purificar células fetales a partir de circulación periférica materna, lo que representa un enorme avance en la seguridad y la premura en conocer la situación genética del feto. El hecho de que se disponga de pruebas no invasivas permitirá realizar un sondeo de rutina a todas aquellas mujeres que lo deseen y no limitarlo a mujeres con un riesgo elevado de transmitir enfermedades genéticas, como sucede en la actualidad. El papel de la sociedad en esta cuestión será, entonces, la capacidad de "controlar la calidad fetal". No hay que olvidar que la mayoría de las pruebas prenatales dan resultados negativos y suministran una enorme tranquilidad a los padres. Incluso en el caso de que los resultados sean positivos y no se opte por el recurso del aborto, el conocimiento que da el análisis fetal otorga a los padres una preparación psicológica que les permite manejar la situación de la mejor manera.

Sondeo neonatal y posnatal

El sondeo neonatal de enfermedades curables como la fenilcetonuria no representa ningún problema ético, ya que el conocimiento obtenido permite a los padres tomar las medidas terapéuticas adecuadas y oportunas. Los problemas se presentan cuando con este tipo de pruebas se detecta una enfermedad incurable o de difícil tratamiento. En este caso, el problema estriba en el desasosiego que se les puede crear a los padres. En ese sentido, la pregunta que se plantean los legisladores es si los padres tienen derecho de conocer si su hijo es propenso a desarrollar una enfermedad genética incurable que sólo se desarrolla en la edad adulta. Muchos moralistas y juristas responden negativamente a este cuestionamiento. De todas formas, al llegar a la edad reproductiva, los individuos afectados deberían tener acceso a esa información, con el objeto de considerar opciones de procreación en las que el gen mutante no se transmita a la descendencia.

Individuos sanos portadores de enfermedades genéticas

El sondeo de portadores sanos (individuos heterocigotos que portan una copia del gen afectado) es muy importante, ya que tiene el objetivo principal de informar al individuo afectado que cuenta con una carga genética que puede transmitir una enfermedad. El individuo, entonces, deberá reconsiderar de acuerdo con sus principios éticos y morales la posibilidad de no tener hijos, adoptarlos o recurrir a técnicas de reproducción asistida con gametos de donante. En el caso de poblaciones con gran incidencia de enfermedades genéticas, el objetivo del sondeo génico será suministrar asesoramiento general que evite el nacimiento de individuos afectados.

Aspectos éticos del Proyecto del Genoma Humano

Los alcances reales del PGH han generado ansiedad en el público, debido al desconocimiento general en relación con las implicaciones médicas, éticas y legales que puedan tener las pruebas genéticas sugeridas por los médicos. Existe una latente preocupación social sobre el mal uso de los datos genéticos, ya que dicha información podría usarse para discriminar a individuos y poblaciones, sobre todo en sociedades catalogadas como racistas. Por eso, en 1989 se estableció en Estados Unidos el subprograma ELSI (Ethical, Legal and Social Issues), cuyo objetivo principal fue brindar asesoramiento al gobierno sobre temas éticos, sociales y legales

relacionados con el estudio del genoma humano. En varios países se crearon comités cuya función primordial era efectuar una estricta supervisión entre la comunidad médica sobre la necesidad de realizar pruebas genéticas a los pacientes. ELSI también desarrolló una serie de programas educacionales dirigidos a entrenar a profesionales de la salud en la interpretación de las nuevas pruebas diagnósticas basadas en el análisis del ADN.

Por otra parte, existe una preocupación justificable de que las pruebas genéticas, sobre todo las que detecten predisposición a enfermedades genéticas, puedan servir para discriminar laboralmente a las personas, ya que las empresas podrían seleccionar al personal según su "salud genética". Por otra parte, las compañías de seguros tenderían a manejar los datos genéticos en su provecho, negando cobertura a determinados individuos (como ya ha ocurrido en Estados Unidos) o imponiendo primas altas. En relación con esto, algunos países están imponiendo moratorias al uso de datos genéticos por parte de las aseguradoras, aunque éstas también están presionando para tener acceso a las pruebas de ADN de los potenciales asegurados.

El Proyecto del Genoma Humano, parte de un proyecto genoma universal

En paralelo al Proyecto del Genoma Humano, se desarrollaron otros "proyectos genoma", en que se caracterizaron y secuenciaron genomas de otros organismos, como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), el ratón y el chimpancé, cuya comparación entre sí y con el acervo genético humano acelerará notablemente la obtención de importantes datos sobre la organización, la función y la evolución del ADN.

La creación de bases de datos donde se encuentra almacenada toda la información generada por el PGH y de los otros proyectos genoma hoy día es una realidad. En estos momentos es posible ingresar, vía internet, a estas bases de datos, que son sitios de libre acceso, para conocer las secuencias de los genes de las diversas especies animales y vegetales secuenciadas. El conocimiento de las secuencias génicas permitirá determinar la función de cada gen y de qué manera los factores ambientales influyen en las mutaciones y alteran su expresión (figura 32-2).

El Proyecto del Genoma Humano y la terapia génica

Sin lugar a dudas, los conocimientos obtenidos del PGH permitirán realizar ***terapia génica*** en células germinales, con la finalidad de prevenir la expresión de genes implicados directamente en el desarrollo de enfermedades, malformaciones e impedimentos. De igual manera, la terapia génica puede aplicarse a células somáticas en útero, utilizando vectores que transporten los genes sanos hasta el interior de la célula y, una vez allí, se espera que ocurra el reemplazo del gen o genes defectuosos por los genes sanos. Sin embargo, la terapia génica en células germinales, cuyas modificaciones pasarían a las generaciones subsecuentes, despierta el temor en la sociedad de la creación de progenies con genes seleccionados que mejoren las características y rasgos de los hijos, con bebés "ideales".

Producción de organismos transgénicos

Otra cuestión que genera inquietud y produce incertidumbre entre las personas es la posibilidad de crear nuevas formas inéditas de vida, es decir, organismos transgénicos. De hecho, en la actualidad puede observarse la producción tanto de plantas como animales modificados genéticamente con fines alimentarios. Si esta práctica genera inquietud, qué decir de la posibilidad de *confeccionar* nuevas formas de vida, como animales personalizados que contengan genes humanos (como cerdos transgénicos), que pueden servir como "incubadoras de órganos". Los órganos de estos animales (hígado, riñón o corazón) tendrán genes compatibles con los de su dueño y servirían de órgano de reemplazo, en caso de que la persona necesite un trasplante. Pero el mayor temor, sin lugar a dudas, es que algún científico sin escrúpulos sea capaz de mezclar la información genética de varias especies para crear nuevos seres transgénicos, e incluso es probable pensar que se produzcan diseños de "individuos sobre pedido", con lo que existiría la posibilidad de crear una "nueva especie humana".

El genoma humano y la clonación humana

La posibilidad de clonación humana hoy día es una realidad. En Gran Bretaña, por ejemplo, las cámaras legislativas autorizaron la clonación de embriones humanos para propósitos de investigación con fines terapéuticos. Estas prácticas han creado un enorme revuelo en la sociedad, especialmente en los sectores religiosos. Una vez que se depure y se garantice que no hay daños ni riesgos para el clon, la clonación puede ser factible, por ejemplo para personas infértiles o para portadoras de genes que indudablemente llevarán al desarrollo de una enfermedad mortal.

Por otro lado, el hecho de que un clon sepa que cuando tenga 60 años o más lucirá físicamente como su original o que tendrá los mismos problemas de salud que éste podría generarle ansiedad y depresión. Todo ser humano tiene derecho a no saber, o a ignorar, su devenir biológico. No sería deseable que el clon supiera que cuando llegue a los 30 años padecerá de esquizofrenia (lo cual ya sabe que le ocurrió al ser original del cual es un clon). Si el mal que sabe que padecerá el clon puede remediarse, sería conveniente conocerlo de antemano, pero si no se conoce la solución sería doloroso saber lo que le espera sin tener la solución disponible. Los motivos para que una persona opte por clonarse pueden ser

éticamente cuestionables, tal es el caso que se produzcan clones como monumentos a la vanidad del que puede pagar el costo de muchos clones que circularían por las calles como testimonio visible de cómo era físicamente el clonado. No importa que el clonado haya sido un gran filántropo, un hombre o mujer célebre por sus hazañas éticas o científicas. Tampoco sería éticamente aceptable clonar a un ser humano *sólo* para que sirva de incubadora de órganos para el individuo original. Quizá sería justificable en algunos casos crear un clon para que done un riñón a su hermano antecesor enfermo, pero, ¿sería inmoral la obtención del corazón o del hígado, lo que sin duda provocaría su muerte?, ¿debe prohibirse la clonación reproductiva? Es una pregunta muy difícil de responder; sin embargo, la actitud y el énfasis de las sociedades no debe ser la de prohibirla, sino exhortar a los científicos a que actúen con responsabilidad. Una cultura de responsabilidad establecerá que las tecnologías como la clonación sólo se aplicarán a seres humanos cuando se esté razonablemente seguro de que tales técnicas no causarán daño a las personas que opten por la clonación ni al clon.

Ejercicios de integración

1. ¿Cuáles fueron los motivos que propiciaron el Proyecto del Genoma Humano?
2. Mencione las principales aportaciones del Proyecto del Genoma Humano a la medicina.
3. ¿Por qué el genoma humano se considera patrimonio de la humanidad?

Bibliografía

Annas G. *Gene mapping: using* law *and ethics as guides*. Nueva York: Oxford University Press, 1992.

Callahan D. *Biotechnology and ethics: a blueprint for the future*. Hasting Center Report, mayo 1996.

Cavalli-Sforza L. *Proyecto de diversidad del Genoma Humano*. Presentado a UNESCO. París, septiembre de 1994.

Collins F. Medical and societal consequences of the Human Genome Project. N *Engl J Med*, 1999;341:28-37.

Figueroa G. *Información genética y derecho a la identidad personal*. Ponencia presentada al Segundo Encuentro Latinoamericano de Bioética y Genoma Humano. Buenos Aires, Argentina, noviembre de 1998.

Hammer D., Copeland P. *Living with our genes*. Nueva York: Anchor Books-Random House, 1998.

Martínez S.M. *Manipulación genética y derecho penal*. Buenos Aires: Editorial Universidad, 1994.

Murphy T. Mapping the human genome. En: Kuhse H., Singer P., editores. *A companion to bioethics*. Oxford: Blackwell Publishers, 1998:198.

Pennisi E. The human genome. Science, 2001;291(5507):1177-1182.

UNESCO. *Declaración universal sobre el genoma humano y los derechos humanos*. Aprobada en la 29ª Asamblea General de la UNESCO, 11 de noviembre de 1997.

Yáñez E. *Proyecto Genoma: aspectos sociales y éticos*. España: Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 1998.

Índice alfabético

Los números de página seguidos por *f* y *c* corresponden a figuras y cuadros, respectivamente.

A
Ácidos grasos omega 279
Ácidos nucleicos, 25-35. *Véase también* ADN, estructura; ARN, estructura
  ácido desoxirribonucleico (ADN), 25
    almacenamiento de información genética, 25
  ácido ribonucleico (ARN), 25
    transferencia de información del ADN, 25
  cadenas de ácidos nucleicos o polinucleótidos, 26
  composición de los ácidos nucleicos, 25
    bases nitrogenadas, 25
      pirimidinas, 25
      purinas, 25
    pentosa, 25
      estructura hemiacetal de ribosa y desoxirribosa, 26*f*
  información genética, 25
  nucleósidos, 26
  nucleótidos, 26
    nomenclatura, 26
ADN, estructura, 27
    circular, 29
      moléculas, 30*f*
    desnaturalización y renaturalización, 30
      agentes desnaturalizantes, 30
      pérdida de la estructura helicoidal, 30
      temperatura de fusión, 31
      topoisomerasas, 31
    niveles de empaquetamiento del ADN, 31*f*
      asas cromatínicas, 30, 31*f*
      cromosoma condensado, 30, 31
      cromosomas mitóticos, 30
      nucleosoma, 30
        histonas, tipos, 30
      solenoide, 30
        cromatina, 30
    primaria, 27
      bases nitrogenadas, 27
    secundaria, 27
      doble hélice del ADN, 27
      reglas de Chargaff, 28
    variantes de la doble cadena de ADN, 28
      formas estructurales principales, 28
  secuencia del, y microarreglos, 160
Agencia Mundial Antidopaje, 650
Ambientales, enfermedades, 188
    físicas, 188
    químicas, 188
Anemia de Fanconi, 87
  anomalías esqueléticas, 87
  baja estatura, 87
  en antebrazos, 87
  heterogeneidad genética, 87
Animales transgénicos, 268-276
  animales *knockout*, 269*f*
  aplicación de los animales transgénicos, 274
    mejora del ganado, 274
    modelos de enfermedad, 274
    producción de proteínas recombinantes, 274
      animales de granja, 274
      fluidos biológicos, 96
  clonación, 274
    animal, 275
      objetivo económico, 275
      oveja Dolly, 13*f*, 275
    humana, 275
      aspectos éticos, 275
      deseo de mejorar la especie, 275
    organismos multicelulares, 274
      gemelos idénticos o mellizos, 275
    unicelular, 274
  creación de un transgén, 268
    control de la expresión de los genes, 269
    estructura del gen, 270*f*
    genes exógenos o foráneos, 269
  definición, 270
  ingeniería genética, 269
  ratones transgénicos, 269-270
    era posgenómica, 270
      generación, 270
        de ratones, *knockout*, 271
      integración aleatoria del transgén, 271
      microinyección pronuclear de transgenes, 270, 270*f*
      proceso de, 271*f*
    genotecas, sondas y anticuerpos, 270
    proyecto del Genoma Humano, 270, 305
      recombinación homóloga, 270
Antagonistas del CCR5, 249
Antioxidante protector, 280
ARN, estructura(s), 32
    primaria y secundaria, 32
    terciaria, 32
  tipos de, 32
    enzimas, 34
    heterogéneo nuclear, 32
    mensajero (ARNm), 32
    miARN, 34
    pequeño nuclear (ARNsn), 34
    ribosomal (ARNr), 33
    siARN, 34
    transferencia (ARNt), 33

Ataxia telangiectasia, 86, 88-89
complejo fenotípico clínico, 88
gen supresor de tumor ATM, 88
Autosómica dominante, enfermedad, 185,185*f*
Autosómica recesiva, enfermedad, 185, 185*f*
hemoglobinopatías, 185

B
Bardet-Biedl, síndrome de, 224
Bases moleculares de las patologías humanas, 183-190
clasificación de las enfermedades humanas, 184
alteraciones genéticas según el genoma afectado, 184
alteraciones genéticas según su extensión, 184
mutación a gran escala, 184
mutación mediana, 184
mutación puntual, 184
enfermedades exógenas, adquiridas o ambientales, 184
enfermedades monogénicas o mendelianas, 184
mitocondriales, 184
nucleares, 184
enfermedades multifactoriales o de origen complejo, 188
malformaciones congénitas, 189
mutación, 188
errores congénitos del metabolismo, 183
genómica, 184
rastreo y diagnósticos en las afecciones genéticas, 189
pilares del diagnóstico, 189
principales padecimientos que se detectan, 189
programa de tamiz neonatal, 189
rastreo de poblaciones en riesgo, 189
tipos de diagnóstico, 183
clínico, 183
molecular, 183
tratamiento y prevención de enfermedades genéticas, 190
medidas paliativas, 190
terapia génica, 257
ventajas clínicas en la práctica médica, 183
Biología molecular del deporte, 287-297
actividad física, 287
beneficios para la salud, 287
consumo de calorías, 287
aplicación de la, 295
atletas de alto rendimiento, 295
ventajas genéticas, 295
cambios fisiológicos por el ejercicio constante, 289
agrandamiento de los pulmones, 289
aumento del tono muscular, 291
en la expresión génica, 289
genes antioxidantes, 292, 297
genes cardiovasculares, 292, 297
genes de la energética en el músculo, 297
genes el metabolismo, 292, 297
genes que regulan el tamaño muscular, 297
determinantes génicos que favorecen la actividad física, 292
factor de crecimiento similar a la insulina tipo I, 295
gen *ACTN3*, 293
gen *AMPD1*, 293
gen *BDKRB2*, 294
gen de la enzima conversiva de angiotensina, 294
miostatina, 295
$VO_{2máx}$ y genética, 288
entrenamiento, 292
tipos de fibras musculares y rendimiento deportivo, 288
cantidad de glucógeno almacenado, diferencia, 289
contracción lenta (fibras tipo I), 289
contracción rápida (fibras tipo II), 289
funciones cardiorrespiratorias, 288
vías energéticas, 287-288, 289*f*
aeróbica, glucólisis, 288
lipólisis, 288
anaeróbica, aláctica, fosfocreatina, 287
láctica, glucólisis, 287
Biológicas, enfermedades, 188
bacterias, *Staphylococcus aureus*, 188
priones, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, 188
virus del papiloma humano, 188
Bloom, síndrome de, 87
mutaciones en el gen *BLM*, 87
recombinación homóloga, 87
Buffer de corrimiento, 113

C
Cáncer, 197-203
bases moleculares del, 197-203
ciclo celular, 197
regulación, 197
enfermedad multifactorial, 197
genes supresores de tumores, 197
antioncogenes, 198
naturaleza clonal del cáncer, 200
p53, 200, 201
marcador en la evolución de la enfermedad, 201
mutuaciones puntuales, 201
síndrome de Li-Fraumeni, 201
pérdida de heterocigosidad, 200
retinoblastoma, 200
inactivación del gen *Rb*, 201
teoría de los dos golpes, 200
oncogenes, 197
antioncogenes, 198
protooncogenes, 198
versiones alteradas, 198
sarcoma de pollo, 197
virus del sarcoma de Rous, 197
predisposición genética al cáncer, 202
expansión clonal, 202
poliposis adenomatosa familiar, 202
retinoblastoma infantil, 202
síndrome de Li-Fraumeni, 201
protooncogenes y genes supresores de tumor de interés biomédico, 199
cinasas citoplasmáticas, 200
factores de crecimiento, 200
factores transcripcionales, 200
proteínas G asociadas a membrana, 199
receptor con actividad de tirosina cinasa, 199
transducción de señales, 199*f*, 199
teoría de las mutaciones múltiples, 202
cáncer de colon, 202
naturaleza clonal, 202
transformación maligna, 202
virus y cáncer, 201
cervicouterino, 201
tipos virales de VPH de alto riesgo, 201
Célula pancreática, procesamiento en la, 207
Chargaff, reglas de, 7*f*, 28
Ciclo celular, 15-24
células de acuerdo a su potencial proliferativo, 15
estables, 15
lábiles, 15
permanentes, 15
control del, 19, 21*f*
ciclinas, 19

cinasas dependientes de ciclinas, 19
factor promotor de la mitosis, 20
puntos de revisión, 20
proteínas supresoras de tumores, 20
sensores, proteínas, 20
cromatina, 16
división celular, 16
duración del, 16, 16*f*
fase de compactación o división (M), 17
áster, 17
centrosomas, 17
centriolos, 17
ciclo del centrosoma, 17
citocinesis o citodiéresis, 18, 19
anillo contráctil, 19
separación física del citoplasma, 19
tabique o fragmoplasto, 19
citoesqueleto, 17
estructuras filiformes, 17
cohesinas, 17
condensinas, 17
mitosis, 17, 18, 18*f*
separación cromosómica, 18
fase de descompactación (G_1), 16
número constante de cromosomas diploides, 16
punto de inicio, 17
fase de duplicación o síntesis, 17
cohesinas, 17
replicación del ADN de cromosomas individuales, 17
separación de las cromátidas hermanas, 17
fase de preparación para la división de cromatina (G_2), 17
cromosomas, 17
fase G_0 o de quiescencia, 19
fases principales, 15
fase M, 15
interfase, 15
meiosis, 15, 20-22
fases, 22
formación de pares de cromosomas, 22
principio de la teoría celular, 15
regulación del, 20f
reproducción de todos los seres vivos, 15
Clonación molecular, 274
Cloruro de cesio, gradiente con, 108
Collar de perlas, 30
Congénitas, malformaciones, 189
Cortes cohesivos, 122, 123
Creutzfeld-Jacob, enfermedad de, 188
Cromatina, 30
Cromatografía, de absorción, 108
de intercambio iónico, 108
por exclusión de tamaño, 108
Cromosoma X, enfermedad ligada al, 188

D

Declaración de Lausana sobre Dopaje en el Deporte, 298
Diabetes mellitus, 204-217
clasificación de la, 204
destrucción de las células β, 204
y actividad física, 214
AMPK y consumo de glucosa del músculo, 215
aspectos ligados al entrenamiento, 216
ejercicio aeróbico, 215
regulación del transporte de glucosa por insulina, 215
señales hacia el transporte de glucosa, 216
enfermedad endocrinometabólica, 204
epidemiología, 204
incapacidad prematura y definitiva, 204
prevalencia, 204
verdadera epidemia, 204
insulina. *Véase* Insulina
tipo 1, 205
alteraciones metabólicas entre, 205
deficiencia absoluta de insulina, 205
insulitis, 205
y 2, genes de susceptibilidad a, 214
asociados a diabetes tipo 2, 214
genes causales de MODY distintos, 214
tipo 2, 205
alteraciones metabólicas, 205
criterios diagnósticos, 205
daño o falla de varios órganos, 205
estadios de, 206
factores de riesgo genéticos y ambientales, 206
factores genéticos, poligénicos, 205
fisiopatología, 207
glucorregulación, 207
hiperglucemia, 207
tratamiento, 206
esquema terapéutico general, 206
farmacológico, 206
insulina sola o combinada con medicamentos, 207
objetivo, 207
transportadores de difusión facilitada para hexosas, 211
Docosahexaenoico, ácido, 278*f*, 279
consumo de pescado y baja incidencia de cáncer, 279
estructura molecular, 278*f*
grupo de ácidos grasos omega 3, 279
papel antioxidante protector, 280
recomendaciones nutricionales, 280
Dolly, oveja, primer mamífero clonado, 12, 13*f*
Dopaje génico, 298-303
clasificación según la AMA, 298
sustancias y métodos prohibidos, 298, 299*c*
definición, 298
efectos del, con el gen HGF, 303*f*
genes candidatos, 300
bloqueadores de miostatina, 301
eritropoyetina, 300
factor de crecimiento de hepatocitos, 300
factor de crecimiento similar a insulina tipo I, 302
hormona del crecimiento, 300
receptor activado por proliferadores de peroxisomas delta, 300
legislaciones oficiales antidopaje, 298
perspectivas, 303
reseña de eventos trascendentes, 299*c*

E

Edad adulta, enfermedades de la, 189
Electroforesis, 110-119
aplicaciones, 118-119
mapa de restricción, 118
proceso previo a técnicas de hibridación, 118
secuenciación, 118
cámara, 111*f*
de ácidos nucleicos, 115
horizontal, 111*f*, 114-115
buffer de corrimiento, 115*f*
gel de agarosa para ácidos nucleicos, 114
submarina, 114, 115*f*
elementos necesarios, 110
buffer de carga, 114

Electroforesis (*cont.*)
buffer de corrimiento, 113, 115*f*
cámara de electroforesis, 110
geles, 110
acrilamida, 111-113
autopolimerización, 112
electroforesis de proteínas, 113, 113*f*
agarosa, 110, 111
preparación, 112
marcador de peso molecular, 112*f*, 113
transiluminador ultravioleta, 114
migración proporcional de las moléculas, 110
procedimiento general de una, 115
proteínas, 115
submarina, 115
vertical, 114-115, 115*f*
gel de poliacrilamida, 115
Enzimas de restricción, 120-126
aplicaciones, 121-124
clonación con vectores, 121
construcción de bibliotecas genómicas, 122
construcción de moléculas de ADN recombinante, 121
mapas de plásmidos o genomas, 121
clasificación, 121
tipo I, 121
tipo II, 121
tipo III, 121
características, 121, 121*c*
ensayos en investigación clínica, 120
factores que afectan la actividad, 124
contaminantes como detergentes y estabilizadores, 124
pureza biológica del ADN, 124
familias de, 123, 123*f*
extremos cohesivos similares, 123
nomenclatura, 121
origen bacteriano, reglas, 121
nucleasas, 120
endonucleasas, 120
exonucleasas, 120
origen, 120
primera nucleasa de restricción, 120
secuencia diana, 120
tipos de cortes producidos por, 122
cortes cohesivos, 122, 123*f*
extremos romos, 122
isoesquizómeros, 123, 123*f*
Estructura molecular, 278*f*
Eucromatina, 30
Extracción de ácidos nucleicos, 99-109
consideraciones, 99
elección del método de extracción, 99
estructura helicoidal, 99
fuerzas hidrodinámicas, 99
fuente del ácido nucleico, 100
cuantificación de ácidos nucleicos, 104
espectrofotometría, 104
constante, 104
dilución, 104
fluorometría, 106
colorantes más empleados, 106
pretratamiento con ADNsas, 106
preservación del ADN, 106
congelación, 106
métodos comerciales, 106
valoración de la pureza del ácido nucleico, 104
contaminación con fenol, 105
y sales, 106
contaminación con proteínas, 104
diferencias entre extracción de ADN y ARN, 107*c*
extracción de ADN, 104*c*
disolución del ADN y adición de ARNasa, 103
lavado del ADN, 103
precipitación de ADN, 103
proteínas y lípidos como solventes orgánicos, 101
técnica de *salting out*, 106
técnica fenol-cloroformo, 100, 102*f*
lisis de las células y liberación del ADN, 101
ventajas y desventajas, 101*c*
extracción de ARN, 106
consideraciones especiales, 107
disrupción de tejido congelado, 107
lisis mecánica o enzimática, 107
soluciones comerciales estabilizadoras, 107
estudios de expresión génica, 106
lisado celular, 106
purificación, 107
soluciones amortiguadoras, 106
total, técnica de isotiocianato de guanidina/fenol-cloroformo, 107
moléculas con características acídicas, 99
otros métodos de extracción, 107-108
cromatografía de absorción, 108
cromatografía de intercambio iónico, 108
cromatografía por exclusión de tamaño, 108
gradiente con cloruro de cesio, 108

F

Fenilcetonuria y fenilalanina, 282
errores innatos del metabolismo, 282
recomendaciones nutricionales, 283
retraso mental, 282

G

Galato de epigalocatecina, 278
asociado a baja incidencia de cáncer, 278
mecanismo de acción, 279*f*
principal componente del té verde, 279
recomendaciones nutricionales, 279
Gametogénesis, 22
Geles, de acrilamida, 111
de agarosa, 110
Genoma Humano, aportaciones del Proyecto del, 305
patrimonio de la humanidad, 306
proyecto del, aspectos éticos, 308

H

Hemofilia, 191-195
antecedentes históricos, 192
enfermedad ligada al cromosoma X, 192
"enfermedad de reyes", 192
factores de coagulación, 192
nivel de actividad, 192
niveles de gravedad, 192
grave, 192
leve, 192
moderada, 192
tipos de, heredada, 192
Hemofilia A, 192-193
deficiencia de la actividad del factor VIII, 192, 193*f*
inversiones intracromosómicas, 193
vía intrínseca de la coagulación, 194, 194*f*

Hemofilia B, 194-195
deficiencia de la actividad del factor IX, 194
modificaciones postraduccionales, 194
Hepatitis B, 194-196, 227-234
carcinoma hepatocelular, 227
diagnóstico molecular, 232
detección de la carga viral, 232
determinación de los genotipos, 233
mutaciones en el promotor central y región precentral, 232
pruebas de resistencia viral, 233
comerciales, 233
diagnóstico serológico, 232
detección del HBsAg, 232
seroconversión del HBsAg, 232
epidemiología mundial, 227
baja endemia en México, 227
distribución heterogénea, 227
mortalidad, 227
prevalencia de portadores crónicos, 227
evaluación del paciente, 231-232
biopsia hepática, 232
estudios de imagen y de laboratorio, 232
frecuencia del monitoreo clínico, 232
prueba virológica, 232
factores que influyen en la gravedad de, 230
carga viral, 230
genotipo del virus de la, 231
alto riesgo de progresión de la enfermedad, 231
distribución geográfica, 231
historia natural, 229-230
carcinoma hepatocelular, 230
cirrosis, 230
factores de riesgo, 230
incidencia anual, 230
evolución de hepatitis crónica, 227, 230
interpretación de las pruebas serológicas, 230
relacionada con la edad, 230
seroconversión del HBeAg, 230
inflamación del hígado, 232
medicamentos aprobados para, 227
mutaciones, de escape, 231
del VHB y su importancia clínica, 231
región precentral y central, 231
región PreS/S, 231
determinante "a", 231
vías de transmisión, 227
virus de, 228
ADN circular de doble cadena, 228
familia *Hepadnaviridae*, 228
genómica y proteómica, 228
fragmentos de lectura abierta, 228
tasa de mutación intermedia, 228
replicación, 228
ciclo de vida, 229*f*
Hepatitis C, 235-240
características estructurales del virus de, 236
genotipos, 236
marco de lectura abierta, 236
proteínas diferentes, 236
reservorios extrahepáticos, 236
virus de ARN de cadena sencilla, 236
desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro*, 235
diagnóstico molecular, 239
detección de ARN viral en suero, 239
determinación del genotipo viral, 239
métodos comerciales, 239
guías para pruebas de ácidos nucleicos, 239*c*
PCR en tiempo real, 239
retrotranscripción, 239
epidemiología mundial, 235
historia natural, 238
aguda, 238
fases, 238
crónica, 238
evolución variable, 238, 238*f*
cirrosis, 238
mortalidad por complicaciones crónicas, 235
carcinoma hepatocelular, 235
cirrosis, 235
proteínas y genes del virus, 236
ciclo de vida, 236, 238*f*
estructurales, 236
P7, 236*c*
central, 236*c*
no estructurales, 236
NS2/3 autoproteasa, 237
NS4A y NS4B, 237
replicación del virus de, 237
receptor clase B tipo I, 237
replicación del ARN viral, 237
traducción de la poliproteína, 237
tratamiento, 239
IFN pegilado, 239
respuesta virológica sostenida, 239
ribavirina, 240
trasplante hepático, 240
vías de transmisión, 235-36
a personal de salud y en práctica de salud, 236
consumo de drogas por vía intravenosa, 235
contacto sexual, 235
inyecciones y transfusiones de productos no seguros, 235
perinatal, 235
Heterocromatina, 30
Hexosas, transportadores de difusión facilitada para, 211
familia de los Glut, 211
Hibridación, técnicas. *Véase* Técnicas de hibridación
Histonas, tipos, 20, 30
Historia de la biología molecular, 3-14
ADN como material genético, 5-8
Alfred Hershey y Martha Chase, 7, 7*f*
síntesis de nuevos viriones, 7
Erwin Chargaff, 7*f*, 13
complementariedad de bases de ácidos nucleicos, 7
estructura lineal para la cadena de ADN, 7
reglas de Chargaff, 7*f*
Frederick Griffith, 5, 5*f*
principio transformante, 5
George Wells Beadle y Edward Lawrie Tatum, 6, 6*f*
resistencia de las bacterias a fármacos, 6
hipótesis de un gen, una enzima, 6
James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick, 7, 8
doble hélice de ADN, 8, 8*f*
Oswald Theodore Avery, Colin Macleod y Maclyn McCarty, 6, 6*f*
ADN, principio transformante, 6
Rosalind Franklin, 7, 8*f*
formas helicoidales distintas de ADN, 7
William Thomas Astbury, 5, 6*f*
nacimiento de la biología molecular, 6
primera cátedra de estructura biomolecular, 6
Charles Darwin, 3, 4*f*
teoría del origen de las especies, 3
mutación, 3

Historia de la biología molecular (*cont.*)
era moderna, 8-14
clonación del primer mamífero (1997), 12
transferencia nuclear, 12
flujo de la información genética, 9*f*
Hamilton Smith, Daniel Nathans, Werner Arber, 9, 10*f*
primer mapa de restricción del ADN, 9
sistemas de restricción de las bacterias, 9
Howard Martin Temin y David Baltimore, 9, 10*f*
nueva enzima transcriptasa inversa, 9
síntesis de ARN viral, 10
Kary Mullis, 11, 11*f*
reacción en cadena de la polimerasa, 11
investigación de la filogenia, 11
secuenciación génica, 11
Mathew Stanley Meselson y Franklin Stahl, 8, 9*f*
replicación semiconservadora del ADN, 8, 9*f*
primer tratamiento de terapia génica, 12
deficiencia de ADA, 12
elección para el tratamiento, 12
proyecto del Genoma Humano,305
aportaciones, 305
reto técnico-científico, 12
secuencia de pares de bases del ADN, 12
Friedrich Miescher, 3, 4*f*
bases nitrogenadas, 3
nucleína, 3
Gregor Mendel, 3, 4*f*
Leyes de la herencia, 6
genes, 3
Thomas Hunt Morgan, 3, 4*f*
herencia fenotípica, 5
rasgos genéticos ligados al sexo, 3

I

Inhibidores de fusión, 249
Isoesquizómeros, 123, 123*f*
Insulina, 207
cascadas de fosforilación estimuladas por, 211
mecanismos, 212*f*
función, 207
cascadas de señalización intracelular, 207
procesamiento en la célula pancreática, 207
receptor, 208
dominios funcionales, 209*f*
inhibición de la señalización, 210
familia de proteínas 210
sustratos, 210
vía de señalización de PI3K, 210*f*
resistencia, 209
anormalidades en las reacciones de señalización, 208
causas para disfunción de células beta, 208
efecto nocivo de ácidos grasos, 208
incremento de peso, 208
señalización, 208
transportadores de glucosa, 208

L

Li-Fraumeni, síndrome de, 201

M

Manejo de muestras para estudios moleculares, 93-98
ácidos nucleicos, 93, 94
análisis molecular, 95, 97
áreas de aplicación de los estudios moleculares, 97
epidemiología, 97
farmacología, 97
infectología, 97
nutrigenómica y nutrigenética, 97, 277
terapia génica, 97
contaminación de muestras y degradación, 96
resultados falsos negativos, 96, 97*f*
resultados falsos positivos, 96, 97*f*
preservación, 96
ADN de leucocitos, 96
ARN o ADN en suero, 96
biopsias, 96
fluidos biológicos, 96
inactivación de nucleasas, 96
temperatura, 96
uso de métodos comerciales, 96
selección de la muestra, 93
ácidos nucleicos de un individuo, 93
estructura genómica, 93, 94*f*
expresión génica, 94
ácidos nucleicos exógenos, 94
ADN exógenos, 94
ARN exógenos, 95
toma de la muestra, 95
ADN o ARN de biopsias, 95
ADN o ARN de glóbulos blancos, 95
ADN o ARN de suero, 95
anticoagulantes, 95
EDTA, 95
guantes y cubrebocas, 95
limpieza total, 95
otros fluidos biológicos, 96
uso de material libre de nucleasas, 95
trastornos o agentes infecciosos detectados, 97
agentes infecciosos, 97
enfermedades adquiridas, 97
enfermedades genéticas, 97
polimorfismos génicos, 97
Mapa de restricción, 124
Mecanismos de reparación del ADN, 82-90
enfermedades humanas asociadas al funcionamiento de los sistemas, 87
anemia de Fanconi, 87
ataxia telangiectasia, 88
síndrome de Bloom, 87
xeroderma pigmentoso, 89
síndromes de inestabilidad cromosómica, 89
sistemas de reparación del ADN, 83
apareamientos erróneos, 85, 90
corrección de los bucles, 85
fenómeno de hemimetilación, 85
proteínas en *E. coli*, 85
directa, 83
alquiltransferasas, 84
fotorreactivación, 83
escisión, 84
bases, 84
nucleótidos, 84
8-oxo guanina, 82
enzimas participantes, 85
roturas de doble cadena, 86
recombinación homóloga, 86
unión de extremos no homólogos, 87
SOS, 85
reparación por escisión de nucleótidos, 85*f*, 86
represor LexA, 85

tipos de daño en el ADN, 82
agentes alquilantes, 82
agentes intercalantes, 82
análogos de bases, 83, 83*f*
daños oxidativos, 82, 83*f*
depurinización, 82
desaminación, 83
energía ionizante, 83
variabilidad genética, 82
Meiosis, 20-24
formación de pares de cromosomas, 22
gametogénesis, 22
I (división reductora), 22
anafase I, 23
metafase I, 22
profase I, 22
cigoteno, 22
diacinesis, 22
diploteno, 22
leptoteno, 22
paquiteno, 22
telofase I, 23
meiosis II (división ecuatorial), 23
anafase II, 23
metafase II, 23
profase II, 23
telofase II, 23
MELAS, síndrome de, 187
MERRF, síndrome de, 187
cuadro clínico, 187
Microarreglos, 167-170
aplicación del ensayo, 168
bioarreglos con genes preseleccionados, 167
bioinformática, 167
interpretación de la secuenciación de genomas, 167
cédula de identificación, 167
diseño, 167
distribución ordenada de genes, 168*f*
duplicado
biológico, 167
técnico, 167
ensayo de microarreglos de proteínas, 167
hibridación, ácidos nucleicos, 167
genómica comparativa, 167
interpretación de los marcajes, 168
nuevos enfoques, 169
soporte o matriz sólida, 167
tecnología de microarreglos, 169
tipo de ensayo, sonda utilizada, 167
Mitocondriales, enfermedades, 187
Mitosis, 17-18
anafase, 18
metafase, 18
profase, 18
prometafase, 18
separación cromosómica, 18
telofase, 18
Monogénicas, enfermedades, 184, 191-196
diagnóstico, 188
hemofilia, 192
madre portadora y padre no, 191
padre afectado y madre no, 191
padre afectado y madre portadora, 191
Mutación(es), 75-81
alteraciones de la información genética, 75
clasificación(es), 75
germinal, 75
inserción de nucleótidos, 76
sin sentido, 77, 78*f*
neutra, 77
pérdida de nucleótidos o deleción, 76
puntual o génica, 76-79
cromosómica, 78
anomalías funcionales, 78
desplazamiento de marco de lectura, 77
frecuencia, 76
genómicas, 79
reversión, 76
translocación de pares de nucleótidos complementarios, 77
sentido equivocado, 77
silenciosa, 77
somática, 75
sustitución de bases, 76
transversión, 76
nivel de afectación, 75
origen de, 79-81
carcinógenos, 80
inducidas, 79
mutágenos, 79
acción, 79
físicos, químicos o biológicos, 80
naturales o espontáneas, 79
polimorfismos, 80
microsatélites, 81
un solo nucleótido, 80
teratógenos, 80
mecanismos, 80
variabilidad genética de una misma especie, 75
variación espontánea o inducida del genoma, 75

N

NARP, síndrome de, 187
Neuropatía óptica hereditaria de Leber, 188
Nucleares, enfermedades, 184
características, 184
enfermedades monogénicas comunes, 184
patrones hereditarios mendelianos, 184
prevalencia, 184
Nucleasas, 120
endonucleasas, 120
exonucleasas, 120
Nucleósidos, 26
Nucleótidos, 26
nomenclatura, 27
Nutrigenómica y nutrigenética, 277-286
dietas inteligentes, 284, 284*c*
guía de nutrimentos específicos, 285*c*
interacción nutrimento gen, 278
nutrición molecular, 277
analogía con la farmacología molecular, 277
estrategia de salud pública, 285
fundamentos, 277
interacciones gen-nutrimento, 282
consumo de etanol y polimorfismos, 283
fenilcetonuria y fenilalanina, 282
lípidos y polimorfismo G-308A de TNFα, 284
interacciones nutrimento-gen, 278
ácido docosahexaenoico, 278*f*, 279
ácido fólico, 281
carotenoides, 280
cinc, 281

Nutrigenómica y nutrigenética (*cont.*)
galato de epigalocatecina, 278
sulforafano, 278*f*, 280
vitamina C, 280
vitamina E, 281
principales objetivos, 278
búsqueda de alternativas nutricionales, 278

O
Obesidad, 218-226
alta prevalencia, 218
comorbilidades, 218
cáncer de mama, 218
enfermedades digestivas, 218
resistencia a la insulina, 218
definición, 218
diagnóstico, 218
índice de masa corporal de la OMS, 218
factores asociados, 223
consumo excesivo de nutrimentos, 223
inactividad física, 223
medio ambiente moderno, 223
genética de la, 223
genes asociados a la, 224
monogénica, 223
poligénica, 224
sindrómica, 223
regulación del hambre y la saciedad, 220
regulación central, 220
vía anorexigénica, 220*f*, 221
vía orexigénica, 221
regulación periférica, 221-222
hormonas pancreáticas, 222
péptidos y hormonas del tracto gastrointestinal, 221
tejido adiposo, 218-220
adipocitos, 219
hiperplasia, 219
hipertrofia, 219
proteínas del, 219
adiponectina, 219
leptina, 219
resistina, 220
Oveja Dolly, clonación, 12, 13*f*, 275

P
Pirimidinas, 26
Polimorfismos de ADN y huella genética, 171-180
alelos, 175
clasificación, 173
no sinónimos, 172
sinónimos o silentes, 172
codones polimórficos, 173
controversias en el análisis de la huella digital, 178
automatización de los procesos, 178
beneficios médicos y socioeconómicos, 179
diagnóstico genético, 178
evidencia de probabilidad, 178
identificación para todas las personas al nacer, 178
divergencia genética, 172
gen, sección de cromosoma, 171
huella genética individual, 172
locus, 172
marcadores genéticos, 172, 174
métodos de detección, 177-178
reglas de Chargaff, 178
Southern blot, 178
tipos, 173
insertion-deletion, 173, 176
fenómeno de transposición, 176
longitud de fragmentos de restricción, 173
variantes alélicas, 173
marcadores polimórficos mitocondriales, 173, 175
herencia materna, 175
ventajas del análisis, 175
de proteínas, 176
análisis mediante electroforesis, 176
diferenciación de isoenzimas en citoplasma celular, 176
del cromosoma Y, 175
repeticiones continuas, 174
análisis de VNTR, 174
desventaja, 175
identificación de parentesco, 179*f*
satélites, microsatélites y minisatélites, 174
secuencias aleatorias, 176
prueba tamiz, 176
un solo nucleótido, 173
utilidad del análisis de patrones o huella digital de ADN, 176-177
ciencia forense, 177
diagnóstico genético, 177
farmacogenética, 177
identificación familiar, 177
identificar efectos secundarios a fármacos, 177
marcadores de susceptibilidad, 177
patologías, 176
riesgo genético, 177
variabilidad genética intra e interespecies, 171
Proyecto del Genoma Humano, 305
aportaciones, 305
homología génica entre especies, 306*f*
aspectos éticos, 308
discriminación laboral, 309
mal uso de los datos genéticos, 308
clonación humana, 309
definición, 305
en la medicina, 307, 308*f*
enfermo-sano, 307
genes que regulan el envejecimiento celular, 307
individuos sanos portadores de enfermedades genéticas, 308
modificación del programa genético del paciente, 307
reacción al medicamento, 307
sondeo neonatal y posnatal, 308
opciones de procreación, 308
sondeo prenatal de enfermedades, 308
control de la calidad fetal, 308
mapas genéticos y físicos, 305
objetivos, 305
parte de un proyecto genoma universal, 309
patrimonio de la humanidad, 306, 307*f*
declaración sobre dignidad, 306
HUGO, protección de la información, 306
primer proyecto, 305
producción de organismos transgénicos, 309
terapia génica, 309
células germinales, 309
Purinas, 25, 28

R
Reacción en cadena de polimerasa, 145-159
aplicaciones, 157
detección de patógenos infecciosos, 157
secuenciación o análisis, 157

cantidad del producto, 149
amplificación exponencial, 150*f*, 156*f*
número de copias por cada ciclo según la expresión, 149
características de amplificación *in vitro* y requerimientos necesarios, 145
ADN molde, retrotranscripción, 146
ADN polimerasa, 146
amortiguador, 146
cloruro de magnesio, 146
desoxinucleótidos, 146
elementos en la reacción, 145
enlace fosfodiéster, 145
iniciadores, 146
diseño y su papel en la especificidad de PCR, 146
discriminación de mARN y gADN, 148*f*
secuencia y longitud, 147
sentido y antisentido, 146
mismas reglas de replicación, 145
diagnóstico como aplicación de la, 157
correlación de variaciones génicas en enfermedades, 157
detección de genomas de patógenos, 157
esquema de la, 148
ciclos de amplificación, 149
alineación, 149
almacenamiento temporal, 149
amplificación final, 149
desnaturalización, 149
extensión, 149
inicio de la desnaturalización, 149
termociclador, 149
calentamiento/enfriamiento por resistencia eléctrica, 149
modalidades de la técnica de, 150
anidada, 152*f*, 153
convencional, 150
análisis de imagen de la banda, 150
electroforesis en gel, 150
valor de intensidad relativa de genes, índice, 150
cualitativa, 152
cuantitativa, 152
tecnología en tiempo real, 156
in situ, 153
múltiple, varias regiones o varios genes, 152
punto final, 153
selectiva, genes silvestres o mutados, 153
semicuantitativa, 152
tiempo real, 153
método 2ΔCt, 152, 156
método 2ΔΔCt, 152
primers LUX, 153
sondas TaqMan, 153
SyberGreen, 153
oligonucleótidos, 145
retrotranscripción como paso previo, 156
reacción para conversión del ARN en ADNc, 146
sensibilidad de la técnica, 149
desventaja, 150
principal característica, 150
Recomendaciones nutricionales, 280
Regulación de la expresión génica, 66-74
control de degradación del ARNm, 73
cola de poli-A, 73
fase S del ciclo celular, 73
factores transcripcionales, 69-70
dedos de cinc, 70
hélice-asa-hélice, 70
hélice-vuelta-hélice, 69
zipper de leucinas, 70
interrupción de la traducción, 73
mecanismo antisentido, 73
recodificación traduccional, 73
niveles de control de la expresión génica, 66
atenuación de la transcripción, 71
control de la traducción, 72
búsqueda de escape, 72
control del transporte de ARN, 71
complejo de poro, 71
control del procesamiento de ARN, 71
tránscritos primarios, 71
edición del ARN, 71
modificaciones postraduccionales, 72
adición de grupos químicos a proteínas, 72
postranscripcional, 70
pretranscripcional, 66-67
acetiltransferasas, 67
coactivador, 67
transcripcional, 67
activación de los factores transcripcionales, 70
mecanismos, 70
control en eucariotes, 68
potenciadores y silenciadores, 69*f*
control en procariotes, 67
operón Lac, 68, 68*f*
elementos CIS, 67
estructura de los factores transcripcionales, 69
factores generales, 69
ensamblaje, 69
factores transcripcionales inducibles, 69
expresión célula-específica, 69
regulación mediante potenciadores, 70
proteínas inhibidoras de la traducción, 73
control negativo de la traducción, 73
Replicación, 36-43
características generales, 36
bidireccional, 36, 37, 37*f*
horquillas de replicación, 37
replicación monofocal, 38*f*
replicación multifocal, 37*f*
discontinua, 37, 38
fragmentos de Okazaki, 38
hebra adelantada, líder o conductora, 37
hebra rezagada o retrasada, 38
semiconservadora, 36
teoría, 36, 37*f*
fase(s), 39
de síntesis del ciclo celular, 36
elongación, 39, 40
inicio, 39, 40, 40*f*
horquillas de replicación, 40
terminación, 39, 40, 41
maduración, 41
replicación de los telómeros, 41
objetivo de la, 36
proteínas que participan, 38
antígeno nuclear de células en proliferación, 38
de unión a cadena sencilla, 38
FEN1/RTH1, 38
helicasa, 38
ligasa, 38
primasa, 38
Rnasa H_1, 38
telomerasa, 38
topoisomerasas, 38

Replicación (*cont.*)
replicación mitocondrial, 42
dos hebras del ADN mitocondrial, 42
modelo del lazo de desplazamiento, 42
Retinoblastoma, 198, 200

S
Secuenciación del ADN, 160-170
estrategia general de, 161*f*
método "didesoxi" de Sanger, 163
análogos de dNTP específicos de terminación de cadena, 163
apilamiento de bandas, 163
principio del método, 163
visualización mediante autorradiografía, 163
método automatizado, 163-164
microrreacciones a temperatura controlada, 164
pirosecuenciación, 165
secuenciación de célula única, 166
secuenciación por terminación fluorescente, 165*f*
sistemas ópticos, 164
método químico o de degradación de Maxam y Gilbert, 160-162
ADN de doble hebra, 160
electroforesis en gel, 160
patrón de guanina/fuerte y adenina/débil, 161
ventajas específicas, 162
secuenciación de alto rendimiento, 166
genoteca de ADN molde, 166
organización de los genes en los genomas, 167
plataformas actuales, 166
secuenciación de transcriptomas, 166
tecnología 166
amplia longitud de lectura de secuencias, 166
Shine-Dalgarno, secuencia, 56
Sulforafano, 278*f*, 280
asociado con baja incidencia de cáncer, 280
efecto modulador en la expresión de genes, 280
estructura molecular, 278
fuentes dietéticas, 280
verduras crucíferas, 280
recomendaciones nutricionales, 280

T
Técnicas de hibridación, 139-144
aplicaciones, 142
infecciones virales en tejidos, 143
mapeo cromosómico, 143
Dot/slot blot, 142
fijación con vacío, 142
electroforesis de ácidos nucleicos, 139
fase estacionaria, 139
fase móvil, 139
geles de agarosa, 139
separación de macromoléculas, 139
fragmentación del ADN, 139
hibridación *in situ*, 139, 143
aspectos técnicos, 143
método histoquímico, 143
Northern blot, 139, 142
aplicaciones, 142
diferencias con, 142
sondas, 140
especificidad de la, 140
oligonucleótidos, 140
Southern blot, 140
aplicaciones, 142
diagnóstico de anemia falciforme, 142*f*
fundamento, 140
marcaje de las sondas, 141
nick traslation, 141
random primers, 142
procedimiento técnico, 140
Técnicas para identificar a un animal transgénico, 271
ELISA, 274
Northern blot, 273
reacción en cadena de la polimerasa, 273
RT-PCR, 273
Southern blot, 273
Western blot, 273
Terapia génica, 257-267
aplicaciones clínicas, 263
agentes infecciosos, 264
cáncer, 264
bloqueo de oncogenes, 264
terapia suicida, 264
cirrosis hepática, 265
enfermedades monogénicas, 265
niños burbuja, 265
ARNi de interferencia, 263
aplicaciones, 263
protocolos clínicos de VIH, 263
mecanismo, 263, 264*f*
secuencias específicas de ARN de doble cadena, 263
características deseables de un vector, 263
facilidad para producirse a títulos elevados, 263
introducción del transgén precisa y estable, 263
metodología de producción rápida y reproducible, 263
respuesta inmune nula o mínima en el huésped, 263
métodos de envío de genes, 258-259
características principales, 259*c*, 260*c*
vectores no virales, 258
físicos, 260
químicos, 261
vectores virales, 261
adenovirus, 262
condiciones del vector ideal, 261
herpes virus, 261
retrovirus, 261
ventajas y desventajas, 262*c*
virus adenoasociados, 262
opciones en la manipulación genética, 257
adición génica, 257
supresión génica, 257
para deficiencia de la enzima adenosín desaminasa, 265*f*
perspectivas, 266
protocolos clínicos registrados ante la FDA, 257
tipos de terapia génica, 257-258
según la metodología, 258
terapia génica *ex vivo*, 258
terapia génica *in situ*, 258
terapia génica *in vivo*, 258
según tipo celular, 257
células germinales, 257
células somáticas, 257
vectores más utilizados, 257
Traducción, 52-65
código genético, 52-54
bases nitrogenadas del ADN, 52
características, 53
codones de terminación, 54
degeneración de la tercera base, 53
universalidad, 54
grupos de nucleótidos, 52

componentes del complejo traduccional, 54
ARNm, cadena molde, 54
ARNr, 54
ribosoma, 54, 55
ARNt, anticodón, 54
fenómeno de bamboleo, 55
reglas, 55
teoría de complementariedad de base, 55
interacción codón/anticodón, 55
fases de la traducción, 55
activación de los aminoácidos, 56
aminoacil-ARNt, 56
elongación de la síntesis de proteínas, 57
desplazamiento del ribosoma, 57
nuevo peptidil-ARNt, 58
inicio de la síntesis de proteínas, 56
reconocimiento del codón AUG, 56
secuencia de Kozak, 56
secuencia Shine-Dalgarno, 56
unión codón/anticodón, 56
terminación de la síntesis de proteínas, 58
factor de, 59
factores de liberación, 58
inhibidores de la síntesis de proteínas, 63
antibióticos, 63
bloqueo de factores de elongación, 63
cloranfenicol, 64
inductores de errores en lectura del ARNm, 64
aminoglucósidos, 64
estreptomicina, 64
gentamicina, 64
kanamicina, 64
inhibición de formación de enlace péptido, 64
puromicina, 64
inhibición del reconocimiento de aminoacil-ARNt, 64
tetraciclinas, 64
translocación del peptidil-ARNt, 64
macrólidos, 64
mecanismo de replicación del ADN, 52
modificaciones postraduccionales, 60
acetilación, 61
carboxilación, 61
complejo ribosomal, 60
formación de puentes disulfuro, 62
enlaces covalentes, 63
sensores de la oxidación, 63
fosforilación, 61
glicosilación o glucosilación, 62
hidroxilación, 62
metilación, 61
modificación con lípidos, 62
acilación, 62
prenilación, 62
principales mecanismos, 61
procesamiento proteolítico, 63
procesos biológicos, 63
proteínas chaperonas, 61
sulfatación, 62
moléculas con acción sobre la traducción, 64
polimerización, 52
tráfico o destino de las proteínas, 59
organelos, 59
péptido señal o etiqueta señal, 60
mecanismo de acción, 60
señales de clasificación, 60
transcripción, ARN mensajero, 52
Transcripción, 44-51
cadena molde, 44
corte y empalme, 44
ayustosoma, 50
remoción de los intrones, 50
sitio de ramificación, 50
variantes del ARNm, 50
edición del ARN, 50
mecanismos, 50
estructura del gen, 44
caja TATA, 45
eucariotes, 46
procariotes, 46
promotores proximales, 46
regiones regulatorias, 46
secuencias que regulan la transcripción, 46*f*
silenciadores, 47
tránscrito primario, 44
factores transcripcionales, 45
generales o basales, 48
inducibles, 48
genes, 44
locus, 44
procesamiento del ARN, 46*f*, 49-50
proceso de maduración, 49
reclutamiento de enzimas para poliadenilación, 50
proceso de transcripción, 48-49
elongación, 49
iniciación, 48, 49
núcleo, 48
terminación, 49
regulación de la transcripción, 51
expresión diferencial de sus genes, 51
tipos de ARN polimerasa, 47
enzimas productoras de ARN, 47*f*
Transiluminador ultravioleta, 114

V

Vector(es), de clonación, 127, 130*f*
bacteriófagos, 129
lambda, genoma, 129
parásitos intracelulares, 129
silvestre, modificado genéticamente, 129
características de los, 129*c*
clasificación de, 127
y expresión, 127
cósmidos, 129
cromosomas artificiales, 129
elementos que forman un, 128
marcador de selección, 128
origen de replicación, 128
sitio de clonación múltiple, 128
molecular, 131
aplicaciones de la, 135-137
genotecas, 135
ADNc, 135
ADNg, 137
producción de proteínas recombinantes, 137
bacterias, 137
biorreactores vegetales, 137
células de insecto, 137
plantas, 137
estrategia general de clonación, 132*f*
identificación de colonias con el vector recombinante, 131
ligación del inserto con el vector, 132
preparación de células competentes, 133

Vector(es), de clonación (*cont.*)
preparación del inserto a clonar, 131
preparación del vector para clonación, 131
transformación de bacterias, 132*f*, 136*f*
plásmidos, 129
material genético móvil de las bacterias, 129
plásmidos más utilizados, 129
replicación y transcripción plasmídica, 129
transducción, 135
transfección, 135
transformación celular, 131
de expresión, 131
componentes, 131
expresión basal del plásmido, 131
promotor fuerte, 121
sitio de unión al ribosoma, 131
Virus de la inmunodeficiencia humana, 241
agente causal del, 241
ciclo de replicación, 242, 244, 245
genoma proviral, 245
liberación de nuevas partículas virales, 246
transcripción inversa, 246
unión con el correceptor celular, 245
clasificación del, 242
transmisión entre primates y humanos, 242
VIH-1, 243
categorías, 243
formas recombinantes circulantes, 243
VIH-2, 243
diagnóstico serológico y molecular, 246
de la enfermedad, 246
criterios internacionales, 247
ELISA, 246
ensayos de detección de ARN del VIH, 247
Western blot, 248
genes estructurales del VIH, 247
ensayos de seguimiento, 247
ARN del VIH, 247
cuantificación de linfocitos T CD4+, 248
pruebas de resistencia a los antirretrovirales, 248
viremia elevada, 246
estructura del virión, 244
copias de ARN de cadena simple, 245
espículas virales, 244
lípidos, 244
genoma viral, 244, 244*f*
genes accesorios, 244
genes reguladores, 244
proteínas estructurales, 244
repeticiones terminales largas, 244
historia natural de la enfermedad, 241
etapa sintomática o sida, 242
aumento de actividad de replicación viral, 242
infecciones oportunistas, 242
fase asintomática, 242
reconstitución del sistema inmune, 242
replicación viral alta, 242
infección primaria, 242
carga viral en plasma, 247
periodo de ventana, 242
signos y síntomas, 242
infección celular crónica, 241
signos y síntomas graduales, 241
terapia antiviral, 248
antirretrovirales aprobados, 249*c*, 249
inhibidores de entrada, 251*c*
antagonistas del CCR5, maraviroc, 249
inhibidores de fusión, enfurvitide, 249
inhibidores de la integrasa, 250
funciones catalíticas, 250
inhibidores de la proteasa, 250
inhibidores de la transcriptasa inversa, 250
análisis de nucleósido/nucleótidos, 250
no-análogos de los nucleósidos, 250
y supresión viral por periodos prolongados, 248
variabilidad genética, 241
alta tasa de mutación del genoma del virus, 241
impacto en la pandemia del VIH, 241
recombinación de dos cadenas de ARN, 241

X
Xeroderma pigmentoso, 87, 89
enfermedad cutánea multigénica, 89
mecanismos de reparación NER, 89
subtipos clínicos, 89
XPA-XPG, genes, 89

Z
Zipper de leucinas, 70

El enorme avance de la biología molecular ha revolucionado la manera de visualizar la medicina y la biología en general, lo que permite una mejor comprensión y un entendimiento más amplio de los procesos biológicos. Los estudios en este campo, aplicados a la medicina y a la ingeniería genética, han originado nuevos conocimientos para ofrecer a los pacientes diagnósticos y tratamientos más certeros, logrando así establecer una conexión estrecha entre las ciencias básicas y las disciplinas clínicas, de forma tal que múltiples universidades la han incluido dentro de sus planes de estudio como una materia obligatoria, tanto de licenciaturas como de maestrías y doctorados.

Este libro permite al lector adentrarse en el campo de la biología molecular presentándole un panorama general y a la vez profundo, con un abordaje sencillo y didáctico. Para ello, el contenido está dividido en cuatro secciones que cubren desde los aspectos básicos, la estructura y función de las principales moléculas que participan en el flujo de la información genética, hasta temas especializados y de interés general como terapia génica, organismos transgénicos, dopaje génico, nutrigenómica y proyecto del genoma humano.

Sin lugar a dudas, el lector tiene en sus manos una herramienta muy útil para el estudio de la biología molecular en el área de las ciencias de la salud, y estamos seguros de que su lectura desarrollará el gusto por esta fascinante rama de la ciencia.

Visite: www.mhhe.com/med/salazar_bmfa1e

Mc Graw Hill Education

978-607-15-0912-3
EAN 9 786071 509123 00000

Síguenos en
@MHEducacion

Encuéntranos en
McGraw-Hill Educación

Visite nuestra página WEB
www.mcgraw-hill-educacion.com